THÈSES

PRÉSENTÉES
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

par

Pierre GALLE

Première Thèse

ANALYSE CHIMIQUE PONCTUELLE DES INCLUSIONS INTRACELLULAIRES PAR SPECTROGRAPHIE DES RAYONS X. APPLICATIONS A L'ÉTUDE DES CELLULES RÉNALES

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté

Présentées et soutenues publiquement le 1er Juillet 1965

M. A. MONNIER	Président
M. R. CASTAING	Examinateurs
M. A. DOGNON	
M. C. KELLERSHOHN	
M. J. HAMBURGER	

L'EXPANSION — EDITEUR

THÈSES

PRÉSENTÉES
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

par

Pierre GALLE

Première Thèse

ANALYSE CHIMIQUE PONCTUELLE DES INCLUSIONS INTRACELLULAIRES PAR SPECTROGRAPHIE DES RAYONS X. APPLICATIONS A L'ÉTUDE DES CELLULES RÉNALES

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté

Présentées et soutenues publiquement le 1er Juillet 1965

M. A. MONNIER	Président
M. R. CASTAING	Examinateurs
M. A. DOGNON	
M. C. KELLERSHOHN	
M. J. HAMBURGER	

L'EXPANSION — EDITEUR

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen

M. ZAMANSKY

Professeurs

MM.	BRELOT.	T Analyse supérieure.
	PRENANT.	T Anatomie et Histologie comparées.
	GRASSE.	T Evolution des êtres organisés.
	PRÉVOST.	T Chimie organique.
	WYART.	T Minéralogie et Cristallog.
	TEISSIER.	T Zoologie.
	MANGENOT.	T Biologie végétale (Orsay).
	AUGER.	T Physique quantique et relativité.
	MONNIER.	T Physiologie générale.
	PIVETEAU.	T Paléontologie.
	ROCARD.	T Physique (E.N.S.).
	CARTAN.	T Mathématiques (E.N.S.).
	LAFITTE.	T Chimie générale.
	N...	T Géométrie supérieure.
	COULOMB.	T Physique du Globe.
Mlle	COUSIN.	T Biologie animale (S.P.C.N.).
MM.	CHRÉTIEN.	T Chimie minérale.
	BOCQUET.	T Zoologie.
	KASTLER.	T Physique (E.N.S.).
	EPHRUSSI.	T Génétique.
	RIVIÈRE.	T Géologie (S.P.C.N.) et Sédimento. (Orsay).
	GAUTHERET.	T Biologie végétale (P.C.B.).
	LUCAS R.	T Recherches physiques.
	THOMAS A.	T Biologie cellulaire.
	ARNULF.	T Optique appliquée.
	MORAND.	T Physique (enseignement).
	SOLEILLET.	T Physique (P.C.B.).
	FORTIER.	T Mécanique expérimentale des fluides.
	DRACH.	T Zoologie.
	QUENEY.	T Météorologie et Dynamique atmosphérique.
	GALLIEN.	T Embryologie.
	EICHHORN.	T Botanique.
	de CUGNAC.	T Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle	CAUCHOIS.	T Chimie physique.
MM.	THELLIER.	T Physique du Globe.
	L'HÉRITIER.	T Biologie générale (Orsay).
	GRIVET.	T Radioélectricité (Orsay).
	PONCIN.	T Mécanique générale.
	DUBREIL.	T Arithm. et Théorie des nombres.
	CHAMPETIER.	T Chimie macromoléculaire.
	CUVILLIER.	T Micropaléontologie.
	JUNG.	T Géologie.
	TRILLAT.	T Microscopie et diffraction électronique.
	WIEMANN.	T Chimie organique et structurale.
	JACQUINOT.	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
	VASSY.	T Physique de l'atmosphère.
	DESTOUCHES.	T Théorie physique.
	AMIEL.	T Chimie générale.
	HOCART.	T Minéralogie et cristallographie.
	MATHIEU J.-P.	T Physique optique.
	COUTEAUX.	T Cytologie.
	MAY.	T Zoologie.
	CHOQUET.	T Théorie des fonctions et topologie.
	FELDMANN.	T Biologie végétale marine.
	GUINIER.	T Physique des solides (Orsay).
	JOST.	T Physiologie comparée.
	FORTET.	T Calcul des probabilités et physique mathématique.
	SCHWARTZ.	T Calcul diff. et intégral.
	CHOUARD.	T Physiologie végétale.
	MALAVARD.	T Aviation (tech. aéron.).
	NORMANT.	T Synthèse organique.
	BENARD.	T Chimie minérale.
	BUVAT.	T Botanique (E.N.S.).
	DUGUE.	T Statistiques mathémat.
	SOULAIRAC.	T Psychophysiologie.
	ULRICH.	T Physiologie végét. appl.
	MARÉCHAL.	T Optique théor. et appliq.
	KIRRMANN.	T Théories chimiques.
	CHADEFAUD.	T Botanique.
Mlle	LE BRETON.	T Physiologie de la nutrit.
MM.	LELONG.	T Application de l'analyse à la géométrie.
	DEVILLERS.	T Anatomie et histologie comparées.
	EHRESMANN.	T Topologie algébrique.
	FRANÇON.	T Physique (S.P.C.N.).
	GLANGEAUD.	T Géographie phys. et géologie dynamique.
	DODEMENT.	T Mathématiques (M.G.P.).
	PISOT.	T Techniques mathématiques de la physique.
	QUELET.	T Chimie organique.
	CAGNIARD.	T Géophysique appliquée.
	LENNUIER.	T Physique (M.G.P.).
	RIZET.	T Génétique (Orsay).
	ROUTHIER.	T Géologie appliquée.
Mme	TONNELAT.	T Physique théorique.
MM.	DIXMIER.	T Mathématiques (M.P.C.).
	SOUCHAY.	T Chimie générale.
	AIGRAIN.	T Electrotechnique générale.
	BRUSSET.	T Chimie systématique.
	LÉVY M.	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Mme	CHAIX.	T Chimie biologique.
Mme	HUREL-PY.	T Biologie végétale (P.C.B.).
MM.	PANNETIER.	T Chimie générale.
	BRUN.	T Mécanique des fluides I.
	LEDERER.	T Chimie biologique (Orsay).
Mme	DUBREIL.	T Mathématiques (agrégat.).
Mme	LELONG.	T Mathématiques II (E.N.S.).
MM.	BELLAIR.	T Géologie (S.P.C.N.).
	COTTE.	T Physique électricité.
	DUBOIS J. E.	T Chimie organique.
	LAMOTTE.	T Zoologie (E.N.S.).
	MICHEL A.	T Chimie minérale (Orsay).
	OLMER.	T Energétique générale.
	ROUAULT.	T Electricité (Orsay).
	GAUTHIER.	T Mécanique appliquée.
	BARCHEWITZ.	T Chimie physique.
	BROSSEL.	T Physique atomique.
	BUSER.	T Physiologie comparée.
	CAMUS.	T Physiologie végétale.
	CASTAING.	T Physique II thermodynamique (Orsay).
	CURIEN.	T Minéralogie et cristallographie.
	MOYSE.	T Physiologie végétale (Orsay).
Mme	CHARNIAUX-COTTON.	T Evolution des êtres organisés.
MM.	POSSOMPES.	T Zoologie.
	PULLMANN.	T Chimie quantique.
	TEILLAC.	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
	TONNELAT.	T Biologie physico-chimique (Orsay).
	VILLE.	T Econométrie.
	WILLEMART.	T Chimie (P.C.B.).
	DODE.	T Chimie (Orsay).

UNIV. LEIDEN BIBL.

	FREYMANN.	T	Recherches physiques.
	GUINOCHET.	T	Biologie végétale (S.P.C.N.) (Orsay).
	ROCH.	T	Géologie.
	SCHATZMANN.	T	Astrophysique.
	TERMIER.	T	Géologie générale.
	ZAMANSKY.	T	Mathématiques générales.
	LUCAS.	T	Géologie.
	ALLARD.	T	Chimie physique.
	BERTHELOT.	T	Physique des particules fondamentales (Orsay).
	BRICARD.	T	Météorologie et physique de l'atmosphère (Orsay).
Mme	ALBE-FESSARD.	T	Psycho-physiologie.
	FRIEDEL.	T	Physique des solides (Orsay).
	JULIA M.	T	Etudes des moléculaires naturelles complexes.
	LENDER.	T	Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay).
	MAGAT.	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle	QUINTIN.	T	Electrochimie.
	MONOD.	T	Chimie du métabolisme.
	BENOIT.	T	Physio. animale (Orsay).
	DE POSSEL.	T	Analyse numérique.
	CHARLOT.	T	Chimie analytique.
	LEMÉE.	T	Ecologie végétale (Orsay).
	GUÉRIN.	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay).
	CHATELET.	T	Chimie (P.C.B.).
	JEAN.	T	Physique nucléaire (Orsay).
	MATTLER.	T	Physique (S.P.C.N.).
	BERGERARD.	T	Zoologie (Orsay).
	BERTEIN.	T	Electronique (Orsay).
	BOUISSIÈRES.	T	Radiochimie.
Mme	COUTURE.	T	Thermodyn. et mécan. phys.
MM.	ELLEMBERGER.	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
	FRANC.	T	Biologie animale (P.C.B.).
	SCHNELL.		Botanique tropicale.
	STLKOWSKI.	T	Physiologie végétale.
	ACHER.	T	Chimie biologique.
	BAUDOIN.	T	Biologie animale (P.C.B.).
	BEAUMONT.		Biologie animale (S.P.C.N.).
	BLAMONT.		Géophysique ionosphère.
	BOUREAU.	T	Botanique.
	CURIE D.		Physique (M.G.P.).
	DURAND-DELGA.	T	Géologie.
	FRÉON.	T	Chimie organique (Orsay).
	HELLER.	T	Physiologie végétale.
	TORTRAT.	T	Calcul des probabilités.
	CAILLEUX.	T	Géologie (S.P.C.N.).
	MAGNAN.		Physique électricité.
	DAUDEL.	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la physique nucléaire.
	ROLLET.	T	Chimie minérale.
Mlle	JOSIEN.	T	Chimie (S.P.C.N.).
MM.	CHEVALLEY.	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
	ARNOULT.	T	Electronique (Orsay).
	CHAPELLE.	T	Physique I (Orsay).
	DELANGE.	T	Mathématiques I (Orsay).
	DENY.	T	Mathématiques générales.
	GERMAIN.	T	Mécanique théorique des fluides.
	LACOMBE.	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
	BROCHARD.	T	Physique (M.C.P.) (Orsay).
	CABANNES.	T	Mécanique générale.
	LESIEUR.	T	Mathématiques I (Orsay).
	MAZET.	T	Mécanique générale (Orsay).
	CAIRE.		Géographie phys. et géol. dynamique.
	COMOLET.		Mécanique des fluides.
	CORABŒUF.	T	Physio. animale (Orsay).
	DELLOUE.	T	Physique de l'exosphère.
	GORENFLOT.		Botanique II (Orsay).
	HOUILLON.		Biologie animale (P.C.B.).
	JULLIEN J.		Chimie (S.P.C.N.) (Orsay).
	MALGRANGE.	T	Techniques math. de la phys. (Orsay).
	OLIVIER.		Anthropologie.
	PRÉVOST G.		Biologie végétale (C.P.E.M.).
	FAVARD.		Biologie animale (C.P.E.M.).
	NOZERAN.	T	Botanique II (Orsay).
	BLANC-LAPIERRE.	T	Physique (E.N.S.) (Orsay).
	CHEVAUGEON.	T	Botanique (Orsay).
	KAHANE.	T	Mathématiques (Orsay).
	SAMUEL.	T	Math. (E.N.S.) féminines.
	KOURGANOFF.	T	Astronomie (Orsay).
	THIRY.	T	Mécanique céleste.
	ABELES.		Physique (S.P.C.N.).
	AMAT.	T	Physique (P.C.B.).
		T	Géologie.
Mme	BENOIST-GUEUTAL.	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
MM.	BOUGIS.		Biologie marine Villefranche-sur-Mer.
	BRUHAT.	T	Mathématiques (M.P.C.).
	BRUNN.	T	Géologie historique (Orsay).
	CHABRAL.	T	Physique (M.G.P.) (Orsay).
	DEHEUVELS.	T	Mathématiques propédeutique.
	D'ESPAGNAT.	T	Physique théorique (Orsay).
	FURON.	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme	GANS.	T	Génétique.
MM.	GENEVES.		Biologie végétale (P.C.B.).
	GUILBERT.		Physique (C.S.U.) Orléans.
	HUPE.	T	Pétrographie.
	HOLLANDE.	T	Biologie générale.
	LIONS.	T	Analyse numérique.
	MAITTE.	T	Chimie (P.C.B.).
	MEYER.		Physique propédeutique.
	NICOLAS.		Géologie appliquée.
	PAGINEL.		Biologie générale.
Mlle	FOURCROY.		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme	CHOQUET-BRUHAT.	T	Mécanique analytique et mécanique céleste.
Mlle	VEIL.	T	Physiologie générale.
MM.	LWOFF.	T	Microbiologie.
	SIESTRUNCK.	T	Mécanique physique et expérimentale.
	NÉRON.	T	Mathématiques (M.P.C.) (Orsay).
Mme	PECKER-WIMEL.	T	Astrophysique.
MM.	BALKANSKY.		Physique (M.P.C.).
	LE CORRE.	T	Electricité.
	DELCROIX.	T	Physique théorique (Orsay).
	GOURDIN.		Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
	LEHMANN.	T	Physique expérimentale des hautes énergies.
	NATAF.	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
	ECHALIER.		Biologie animale (P.C.B.).
	BARRAUD.		Physiologie cellulaire.
	LIORET.	P	Physiologie végétale (Orsay).
	DARS.		Géologie structurale et géologie appliquée.
	CAMEFORT.	T	Botanique (agrégation).
	VICHNIEWSKY.	T	Mécanique industrielle.
	BLAQUIÈRE.		Electronique (Orsay).
	ARNOUS.	T	Physique théorique.
	TATIBOUET.		Chimie (C.S.U., Orléans).
	MALLIAVIN.	T	Mathématiques propédeutiques (Orsay).
	GAUDEMAR.		Chimie propédeutique.
	PEREZ Y JORBA.		Physique expérimentale des hautes énergies (Orsay).
	DAVID.	T	Chimie (agrégation Orsay).
	BROUSSE.	T	Mécanique théorique.
	ROSCH.	T	Astronomie.
	GUY.	T	Physique expérimentale.
	LAZARD.		Mathématiques (M.P.C.).
	MOREL Pierre.		Physique (M.P.C.).
	ARSAC.		Programmation.
	LEFEBVRE.		Chimie (M.P.C.).
	CHAPEVILLE.		Biochimie.
	BENOIT.		Physique (C.P.E.M.).
	RIO.		Chimie (C.P.E.M.).
	JAUZELIN.		Géologie (E.N.S.).
	JANCOVICI.	T	Mathématiques.
	HERVÉ.		Physique atomique (Orsay).

	VILKAS.	Chimie (C.P.E.M.).
Mlle	FICINI.	Chimie (C.P.E.M.).
MM.	LEQUEUX.	Astronomie.
	COHEN-TANNOUDJI.	Physique (M.P.C.).
	TAVERNIER.	Physique (C.P.E.M.).
Mme	ROIZEN.	Physique (C.P.E.M.).
MM.	DURAND M.	Biologie animale (S.P.C.N.).
	RAVIER.	Pétrographie.
	ROSEAU.	T Mécanique théorique des fluides.
	ROUBINE.	Electronique.
	SILBER.	T Chimie (P.C.B.).
	UEBERSFELD.	T Electronique.
	YVON.	T Théories physiques.
	FALK-VAIRANT.	Physique nucléaire.
	FETIZON.	Chimie propédeutique.
	CERF.	Mathématiques (Orsay).
	PASCAUD.	Physiologie.
Mme	PETIT.	Géologie (Orsay).
MM.	BROUSSE.	Biologie animale (C.P.E.M.).
	CAGNAC.	Physique agrégation (Orsay).
	LEBERRE.	Zoologie (Orsay).
	SCHAEFFER.	Microbiologie (Orsay).
	de GENNES.	Physique des solides (Orsay).
	RIOU.	Physique nucléaire expér. (Orsay).
	CLAUSER.	Chimie biologique (Orsay).
	CHEVALIER.	Physiologie animale (Orsay).

Le Secrétaire général

R. POULLAIN.

A notre maître et directeur de recherches,

Monsieur le Professeur J. HAMBURGER.

Thèse de Paris 1965

Centre de recherche sur l'insuffisance rénale
(Professeur M. J. HAMBURGER, Hôpital Necker, Paris)

et

Laboratoire de physique des solides
(Professeur M. R. CASTAING, Faculté des Sciences de Paris, Centre d'Orsay, S.-et-O.)

ANALYSE CHIMIQUE PONCTUELLE DES INCLUSIONS INTRACELLULAIRES PAR SPECTROGRAPHIE DES RAYONS X. APPLICATION A L'ÉTUDE DES CELLULES RÉNALES

Cette étude a été effectuée dans le Centre de recherche sur l'insuffisance rénale chez M. le Professeur J. Hamburger, à l'hôpital Necker, et dans le laboratoire de physique des solides de la Faculté des sciences de Paris, Centre d'Orsay, chez M. le Professeur R. Castaing.

M. le Professeur A. Monnier nous fait le très grand honneur de présider notre thèse. Qu'il nous soit permis de lui exprimer ici nos remerciements pour les encouragements constants qu'il nous a toujours prodigués et l'orientation déterminante qu'il a fait prendre à nos études.

Je suis très reconnaissant à M. le Professeur R. Castaing qui nous a permis l'accès de son laboratoire. Les conseils que nous avons pu y recueillir sous sa haute autorité nous ont été extrêmement précieux. Que M. Ali el Hili et M. Lucien Henry trouvent ici l'expression de notre gratitude.

Je remercie vivement M. le Professeur A. Dognon pour l'intérêt dont il a honoré nos recherches.

INTRODUCTION

La précision atteinte aujourd'hui par les méthodes d'examen morphologique, grâce en particulier à l'emploi du microscope électronique, a permis la mise en évidence, dans les cellules normales ou pathologiques, d'un certain nombre d'inclusions dont la nature chimique nous est totalement inconnue.

Actuellement, un problème se pose donc de plus en plus fréquemment : celui de l'identification chimique des substances présentes dans ces inclusions. Ce problème ne peut généralement pas être résolu par les méthodes habituelles de la cytochimie car le nombre des réactions chimiques utilisables et réellement spécifiques est encore très limité et, même dans les cas les plus favorables, ces techniques nécessitent, au minimum, que l'on ait quelques présomptions sur la nature des substances présentes avant de faire le choix de la réaction histochimique appropriée.

Dans les cas où aucun indice ne permet de soupçonner à l'avance la nature de ces inclusions, il devient nécessaire d'en faire l'analyse chimique élémentaire systématique. Cette analyse doit s'effectuer sur de très petits volumes de matière intra ou extra-cellulaire et, de préférence, par une méthode non destructive, c'est-à-dire n'entraînant pas de modifications de l'architecture tissulaire.

Nous avons donc été amenés, sous la direction du Professeur Hamburger, à rechercher une technique d'analyse des éléments cellulaires in situ basée sur des principes différents de ceux de l'histochimie classique. Nous nous sommes adressés pour cela non plus aux méthodes chimiques mais aux méthodes physiques d'analyse et plus particulièrement, nous avons utilisé les possibilités offertes actuellement par la micro-analyse par sonde électronique. Les méthodes actuelles permettent en effet de déceler dans une préparation, et de localiser dans celle-ci avec une précision topographique de l'ordre de grandeur du micron tous les éléments de la classification périodique dont le nombre atomique est supérieur à 11. Il semblait donc intéressant d'adapter cette méthode à l'étude de la matière minérale présente dans les tissus.

Les « microsondes électroniques » sont surtout utilisées actuellement dans les domaines de la métallurgie et de la minéralogie, dont les échantillons peuvent généralement être analysés sans préparation particulière. Sous réserve d'une préparation préalable indispensable mais simple, nous verrons qu'elles sont également susceptibles d'apporter des renseignements très précieux sur la structure intracellulaire.

Le but de ce travail est de présenter les possibilités actuelles de la micro-analyse par sonde électronique en biologie et les premiers résultats obtenus par cette méthode sur le tissu rénal (*).

Nous envisagerons successivement :

— les principes de la méthode d'analyse ponctuelle ;

— les problèmes posés par les applications biologiques et les techniques de préparation de l'échantillon ;

— les possibilités offertes actuellement sur de telles préparations ;

— les premiers résultats obtenus avec cette méthode lors de son application à l'étude des cellules du rein.

(*) Les analyses ont été effectuées sur une microsonde C.A.M.E.C.A. dans le Laboratoire de Physique des Solides de la Faculté des Sciences d'Orsay.

CHAPITRE I

RAPPEL DES PRINCIPES DE LA MÉTHODE D'ANALYSE PONCTUELLE PAR SPECTROGRAPHIE DES RAYONS X.

a) Principes généraux de l'analyse par spectrographie des rayons X.

On sait depuis les expériences classiques de Moseley, que le spectre de rayons X émis sous l'impact d'un faisceau d'électrons est constitué d'une part d'un spectre continu, et d'autre part d'un certain nombre de raies dites caractéristiques, car elles sont sous la dépendance des atomes constituant l'anticathode. En 1913, Moseley établit une relation entre la longueur d'onde des radiations caractéristiques émises par les atomes bombardés et l'ordre de classement de ces atomes suivant la classification périodique de Mendéleeff ; il s'agit donc là d'un phénomène qui permet de déduire à partir de l'analyse spectrale des rayons X émis par un échantillon, la composition atomique des différents éléments présents dans celui-ci. Le modèle de l'atome de Bohr rend compte assez simplement de ce phénomène ; rappelons que dans ce modèle, l'émission d'une radiation caractéristique $h\nu$ (h = constante de Planck, ν = fréquence de la radiation émise) a lieu chaque fois qu'un électron passe, dans un atome, d'une orbite stationnaire périphérique sur une orbite stationnaire plus profonde : lors de cette transition, l'électron perd une certaine quantité d'énergie W, qui se retrouve dans certains cas sous forme de radiation électromagnétique (transition radiative) : un photon $h\nu$ est émis, sa fréquence est bien déterminée, et telle que $W = h\nu$. W étant une caractéristique de l'atome, la fréquence (ou encore la longueur d'onde) de la radiation sera elle aussi une grandeur caractéristique : la connaissance de cette seule grandeur permettra donc de préciser la nature de l'élément émetteur.

Les longueurs d'onde émises lors des transitions électroniques dans les atomes sont telles qu'elles correspondent au domaine des rayons X dans l'échelle des radiations électromagnétiques. L'extrême simplicité des spectres caractéristiques X, qui ne comportent que quelques raies, élimine généralement tout risque d'ambiguïté dans l'interprétation des résultats donnés par ce type d'analyse spectrale.

b) Les possibilités d'analyse ponctuelle par spectrographie des rayons X.

Le développement plus récent de l'optique électronique a permis l'obtention de faisceaux d'électrons extrêmement fins : les « sondes électroniques ». On désigne sous cette appellation le rassemblement d'électrons sur une très petite surface ; celui-ci est obtenu en formant, au moyen d'une optique électronique, l'image très réduite d'une source émettrice d'électrons. La surface d'impact du faisceau sur une préparation peut avoir des dimensions bien inférieures au micron carré. Le premier appareil susceptible d'effectuer une analyse spectrale des rayons X émis par une telle sonde a été réalisé par R. Castaing (10). Il était devenu possible de déceler dans une préparation, et de localiser dans celle-ci, avec une précision topographique de l'ordre de grandeur du micron, tous les éléments accessibles à l'analyse spectrale X, c'est-à-dire, tous les éléments dont le numéro atomique était supérieur à 11 (sodium).

c) Description schématique de l'appareil.

Celui-ci est représenté sur la figure 1. L'appareil comprend un filament incandescent émetteur d'électrons, un cylindre de Wehnelt, une anode percée d'un trou ; la tension d'accélération entre le filament et l'anode est réglable entre 5 et 35 kilovolts. L'ensemble précédent forme le canon à électrons. Deux lentilles magnétiques vont agir sur ce faisceau de façon que sa surface d'impact sur l'échantillon soit aussi petite que possible. Cette petite surface de l'échantillon bombardé (1 micron carré) joue ainsi le rôle d'anticathode et va émettre dans toutes les directions des rayons X, dont l'analyse spectrale est effectuée grâce à deux spectrographes à cristal courbé recueillant une partie du faisceau X émis sous un angle de 18° environ. L'un d'eux, équipé d'une lame de quartz et d'un compteur Geiger-Müller (ou d'un compteur proportionnel), est destiné à effectuer l'analyse des rayonnements d'une longueur d'onde moyenne (0,6 à 4,5 Å), il permet donc d'analyser les éléments lourds (numéro atomique supérieur à 10). De façon plus précise, il analyse par leur raie K tous les éléments situés entre le chlore et le molybdène, et par leur raie L tous les éléments plus lourds que le molybdène. L'autre compteur équipé d'une lame de mica et d'un compteur proportionnel sert pour analyser les rayonnements plus mous (de 4 Å à 10 Å), émis par les éléments légers (de nombre atomique compris entre 11 et 17 inclus) dont il précise la longueur d'onde de leur raie K. Les appareils les plus récents sont équipés de quatre spectrographes.

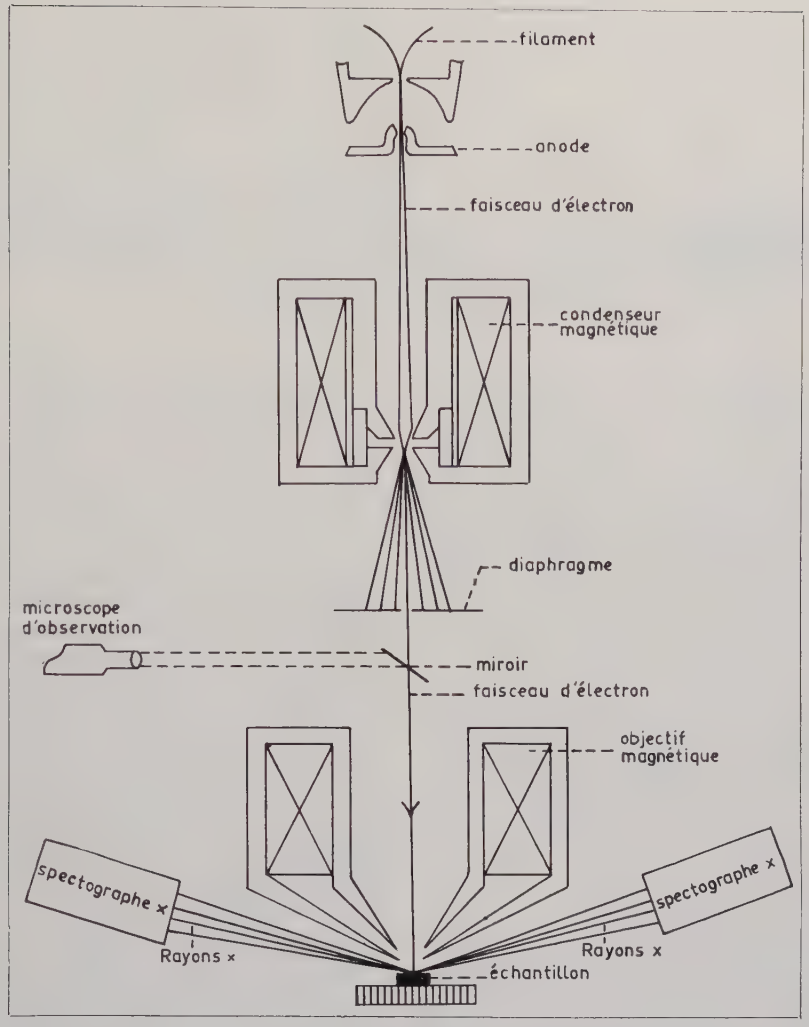


FIG. 1. — Représentation schématique des différents éléments de la microsonde électronique.

d) Dispositif d'observation de la préparation au moment de l'analyse.

L'observation de l'échantillon mis en place dans l'appareil est importante à considérer dans le cadre des applications biologiques, car nous verrons que toute la difficulté consiste ici à rapporter à tel ou tel élément structural, la présence de l'élément décelé. Cette observation se fait habituellement à l'aide d'un microscope spécial équipé d'un objectif à miroirs. Il s'agit là d'un microscope de type métallographique fonctionnant par réflexion. Celui-ci a été prévu pour l'observation d'échantillons massifs (alliages métalliques, échantillons minéralogiques). Pour l'analyse des tissus, nous avons été amenés, pour des raisons d'ordre technique, à faire des coupes de tissu. De tels échantillons peuvent également être observés par réflexion, mais il est bien entendu avantageux et plus simple, ici, d'utiliser un montage d'observation microscopique par transmission, puisque les coupes sont suffisamment fines pour être transparentes. Nous verrons cependant que ce système d'observation est lui-même insuffisant : la sensibilité de l'analyse est en effet telle, qu'elle permet de déceler des éléments structuraux dont les dimensions sont parfois trop petites pour être visibles au microscope à lumière, même en utilisant l'immersion ou d'autres techniques comme le contraste de phase.

LES PROBLÈMES POSÉS PAR LES APPLICATIONS BIOLOGIQUES ET LES TECHNIQUES DE PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Les applications biologiques de l'analyse ponctuelle par microsonde posent des problèmes particuliers concernant la préparation des tissus. Ces problèmes sont différents suivant qu'on s'adresse aux tissus durs ou aux tissus mous. Les quelques travaux consacrés jusqu'ici à ce sujet ont apporté des résultats concernant surtout l'étude des tissus durs (dent, os) ou scléreux comme la cornée. Citons en particulier les travaux de Tousimis (1963) sur la répartition topographique du cuivre dans la cornée d'un malade ayant une maladie de Wilson et de Mellors (1964) sur le calcium et le phosphore de l'os. Nous nous intéressons ici uniquement à l'étude des tissus mous, c'est-à-dire aux cellules et à la substance extra-cellulaire. Cette étude ne peut se faire que sous certaines conditions que nous allons maintenant envisager.

1. Les conditions nécessaires.

L'échantillon destiné à être analysé doit être préparé de telle sorte que sa structure fine ne soit pas détruite par les conditions de l'examen, faute de quoi, toute analyse ponctuelle topographique perdrait son sens.

C'est ainsi qu'il doit 1) résister au vide de 10^{-5} mm Hg qui règne dans l'appareil ; 2) être conducteur de l'électricité ; 3) résister au bombardement électronique intense du faisceau qui risque de l'échauffer trop fortement. Ces trois conditions sont facilement satisfaites pour les échantillons métalliques. Par contre, il n'est pas possible d'analyser les tissus simplement fixés par les moyens habituels sans les soumettre préalablement à une préparation particulière. Il est, dans un premier temps, indispensable d'inclure les cellules dans une matière d'inclusion solide, leur permettant de résister sans dommage au vide qui s'établit assez rapidement dans l'appareil. Toutes ces matières d'inclusion étant des isolants, il sera nécessaire secondairement de rendre la surface analysée conductrice de l'électricité pour éviter au point d'impact des électrons une accumulation de charges électriques, source d'instabilité du faisceau. Enfin on s'arrangera de telle sorte que l'élévation de température soit aussi faible que possible.

2. Les techniques utilisées.

a) Les matières d'inclusion.

On a le choix actuellement entre un grand nombre de matières d'inclusion ; les plus utilisées dans la pratique histologique ou cytologique sont la paraffine, le méthacrylate, le vestopal, l'araldite et ses dérivés. La meilleure de ces matières, c'est-à-dire celle résistant le mieux au faisceau électronique s'est avérée être l'araldite ou, de façon plus générale, les différentes résines d'épichlorhydrine. L'avantage de ces résines est vraisemblablement en rapport avec le fait qu'elles ont une conductibilité thermique moins mauvaise que les autres et un point de dépolymérisation plus élevé. Ceci nous amène à préciser quelles sont les conditions thermiques de l'analyse car nous verrons que celles-ci doivent être prises en considération dans nos applications, alors que dans l'analyse de métaux elles ne sont généralement pas gênantes.

Ces conditions thermiques ont été précisées par R. Castaing (10) : connaissant la puissance qui est délivrée sur l'échantillon par une sonde de 1 micron de diamètre, on peut calculer l'élévation maximum de température θ_m atteinte au centre de l'échantillon lorsque l'analyse s'effectue dans des conditions géométriques définies dans une matière homogène. Dans le cas d'un échantillon massif, le calcul donne : $\theta_m = \frac{3\,W_o}{4\,\pi\,J\,C\,r_o}$ où W_o est la puissance incidente, r_o le rayon du faisceau au point d'impact, C la conductibilité thermique de l'échantillon. On voit donc que θ_m est inversement proportionnel à C, et si, dans le cas d'un métal bon conducteur comme le cuivre (C = 0,9 C.G.S.), l'élévation thermique est négligeable (pour une puissance de 10^{-4} Watts par micron carré, $\theta_m = 0°55$), celle-ci peut être au contraire importante dans le cas d'une substance ayant une mauvaise conductibilité thermique, ce qui est justement le cas des matières d'inclusion utilisables en biologie. Pour la paraffine C = 0,0006 C.G.S., pour le méthacrylate de butyle C = 0,0005 C.G.S., pour l'araldite C = 0,0010 C.G.S. Il s'ensuit que 1) la paraffine est inutilisable étant donné son point de fusion très bas (45°) ; 2) l'araldite est susceptible de s'échauffer deux fois moins que le méthacrylate, ce qui explique vraisemblablement sa meilleure

résistance ; 3) lorsqu'on a besoin d'utiliser un faisceau intense, il est préférable de faire l'analyse de coupes minces de tissus plutôt que celle d'échantillons massifs, puis de déposer cette coupe sur un support ayant une bonne conductibilité thermique : si la coupe est épaisse de 1 micron (épaisseur généralement très suffisante), une fraction seulement de l'énergie du faisceau se distribue dans la préparation, le reste se dissipe dans le support ; l'élévation thermique de l'échantillon est ainsi beaucoup moins élevée.

b) Moyens utilisés pour assurer une bonne conduction électrique.

Nous avons vu plus haut que l'échantillon doit être conducteur sur toute sa surface. Cette condition est facilement réalisée par l'artifice qui consiste à recouvrir celui-ci d'une très fine couche de métal. Cette métallisation a le double avantage d'éviter l'accumulation de charges négatives au point d'impact de faisceau et de faciliter la diffusion de la chaleur. Cette couche métallique doit être suffisamment mince pour rester perméable aux électrons. Ces couches peuvent avoir une épaisseur de 5 à 100 millimicrons. Une couche de 5 millimicrons est suffisante pour assurer une conductivité électrique satisfaisante ; il peut être intéressant de déposer des couches plus épaisses, jusqu'à 100 millimicrons, lorsqu'on veut assurer une meilleure solidité d'ensemble et une meilleure conductibilité thermique. Des couches plus épaisses sont susceptibles d'absorber un nombre trop important d'électrons d'une part et d'augmenter le bruit de fond d'autre part (émission de spectre continu) ; ceci peut donc gêner l'analyse lorsque les éléments recherchés sont en quantité faible. Nous avons généralement utilisé des couches métalliques épaisses de 10 millimicrons. Le métal utilisé a été le nickel qui présente l'avantage de ne pas s'oxyder secondairement. Le mince dépôt métallique a été effectué par vaporisation sous vide. Celle-ci ne présente pas de difficultés ; une longueur déterminée d'un très fin fil de nickel correspondant à quelques milligrammes de métal, est torsadé autour d'un filament de Tungstène, lequel est chauffé sous un vide de 10^{-5} mm Hg jusqu'à sa température de vaporisation. On peut à volonté augmenter ou réduire l'épaisseur de la couche déposée en variant soit la quantité de nickel utilisé, soit la distance filament préparation. D'autres métaux que le nickel peuvent évidemment être utilisés ; il convient toutefois d'éviter que le métal évaporé ne soit pas susceptible d'être présent lui-même à l'intérieur des inclusions analysées ; le fer, le cuivre, le magnésium, sont à cet égard proscrits pour certains examens.

c) Montage de la préparation.

Les trois montages indiqués sur les figures 2, 3 et 4 sont susceptibles d'être utilisés.

Dans le montage n° 1 (fig. 2). L'analyse est faite sur le bloc d'inclusion non coupé : une surface seulement de la préparation est mise à nue, elle doit être rendue parfaitement plane puis recouverte d'une fine couche de métal.

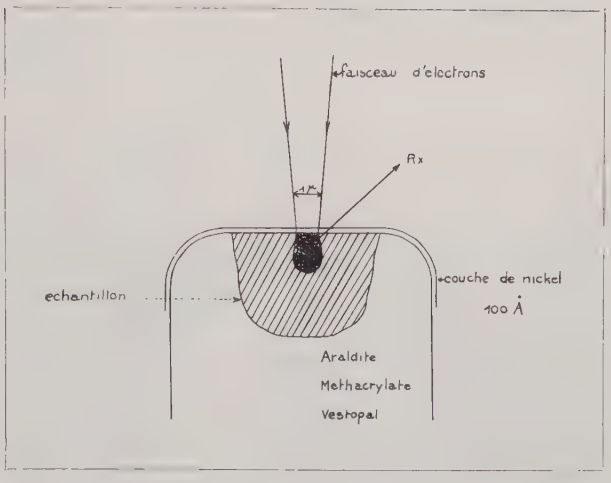


Fig. 2. — Analyse d'un échantillon massif. La partie hachurée représente le fragment de tissu (dont la grandeur est de l'ordre du millimètre cube) ; la partie sombre représente le volume soumis à l'analyse, sa grandeur est de l'ordre du micron cube ; ces deux éléments n'ont pas pu être représentés à la même échelle.

Ce montage a les trois inconvénients suivants : d'une part nous avons vu qu'il se produit des échauffements locaux importants, ce qui nécessite : 1) d'utiliser un faisceau peu intense ; 2) d'évaporer une couche épaisse de métal ; d'autre part l'observation simultanée au microscope à lumière des détails histologiques est extrêmement défectueuse puisque la préparation ne peut être colorée ; enfin la résolution n'est pas très bonne du fait de la pénétration du faisceau en profondeur ; cette profondeur, variable suivant l'énergie des électrons incidents étant approximativement de 10 microns, longueur correspondant à l'absorption de 90 % des électrons de 30 Kev dans une matière de densité 1 (11).

Montage n° 2 (fig. 3). Le bloc d'inclusion est sectionné en une fine coupe de 1 micron d'épaisseur environ à l'aide d'un couteau de verre. La coupe destinée à être analysée est déposée sur une grille porte-objet, du type de celles utilisées pour la microscopie électronique ; il n'est pas nécessaire d'interposer ici une membrane support en collodion ou formvar. Une fine couche de métal épaisse de 100 angströms environ est enfin déposée sur l'ensemble.

Avec un tel montage la préparation peut être observée par un système de microscopie par transmission, cette observation n'étant possible évidemment que pour les portions de l'échantillon situées entre les barreaux de la grille. Nous avons vu que les coupes de tissus inclus dans l'araldite résistent sans modification importante au faisceau électronique. Par contre les coupes de tissus inclus dans le méthacrylate peuvent se disloquer sous l'impact du faisceau si celui-ci est trop intense ; c'est pourquoi il est préférable, lorsqu'on utilise le méthacrylate, d'utiliser le 3e montage.

POSSIBILITÉS OFFERTES PAR L'ANALYSE QUALITATIVE ET L'ANALYSE QUANTITATIVE SUR LES PRÉPARATIONS BIOLOGIQUES

L'appareil permet d'une part, de préciser la nature des éléments présents dans un très petit volume de matière, voisin du micron cube et, d'autre part, de doser les éléments décelés dans ce même volume.

1. L'analyse qualitative

a) Les éléments analysables.

Sur les appareils commerciaux, il est possible d'analyser actuellement les éléments de la classification périodique dont le nombre atomique est supérieur à 11, c'est-à-dire allant du magnésium à l'uranium inclus. La grande majorité des éléments constituant la matière organique n'est donc pas accessible par cette méthode dont les applications en biologie seront limitées aux cas très particuliers des inclusions minérales, cristallines ou non, aux composés organo-métalliques, et d'une façon plus générale aux différentes substances organiques dans la constitution desquelles entrent un ou plusieurs éléments de numéro atomique supérieur à 11. L'étude de la répartition topographique de certains ions minéraux en solution dans les milieux intra ou extracellulaires est également accessible par cette méthode, sous réserve de pouvoir effectuer la préparation spéciale et assez délicate des tissus dont nous avons parlé plus haut.

Des appareils permettant l'analyse ponctuelle d'éléments plus légers que le magnésium sont actuellement en cours d'étude (35) ; ils utilisent des spectrographes équipés de cristaux à large maille (stéarates) permettant d'effectuer l'analyse spectrale des rayons X de grande longueur d'onde. Ces appareils, susceptibles d'effectuer l'analyse des éléments légers jusqu'au béryllium compris (numéro atomique 4), permettront sans doute d'élargir considérablement les possibilités de l'analyse ponctuelle en biologie.

b) Sensibilité.

La sensibilité est limitée par différents facteurs dont les uns dépendent des instruments utilisés (bruit de fond des compteurs), les autres de la préparation elle-même. Les préparation biologiques contenant des inclusions minérales se prêtent particulièrement bien à l'analyse qualitative (à condition de s'arranger pour que l'échantillon ne soit pas détruit par le faisceau) car l'environnement des dépôts analysés est constitué par de la matière organique, c'est-à-dire par une matière susceptible d'émettre un minimum de radiations parasites (radiations caractéristiques ou de spectre continu) augmentant le bruit de fond.

Si on veut garder une bonne sensibilité, la préparation des tissus sera dominée par deux soucis majeurs : garder à l'analyse son caractère non destructeur tout en s'arrangeant pour qu'aucun artifice ne vienne trop augmenter le bruit de fond. La sensibilité a pu être appréciée sur des préparations montées suivant le schéma n° 3, dans le cas du fer, en prenant comme test l'analyse de cet éléments contenu dans un globule rouge. Le globule rouge a été déposé pour cela sur un bloc de graphite. La sonde utilisée avait un diamètre d'environ 2 microns, le courant débité était 0,02 microampère, la tension d'accélération 25 kilovolts. La très faible quantité de fer présente sous l'impact du faisceau était encore décelable par comptage. Le nombre de coups donnés par le compteur du spectrographe successivement réglé sur la raie $K\alpha_1$ du fer ($\theta = 16°49$), puis déréglé, est indiqué ci-dessous.

Raie $K\alpha_1$ du fer					
Nombre de coups pendant 100 secondes	93	98	99	92	95
Bruit de fond (spectrographe déréglé)					
Nombre de coups pendant 100 secondes	48	49	51	55	46

Le nombre d'impulsions donné par la raie caractéristique est encore supérieur de près de 100 % au bruit de fond. La quantité de fer soumise à l'analyse est ici très faible ; on peut la calculer connaissant le nombre de molécules d'hémoglobine contenues dans un globule rouge (280 millions de molécules). Le rayon du globule rouge étant environ de 3,5 microns, sa surface est égale à $(3,5)^2 \times 3,14 = 38,36$ microns carrés. Le nombre de molécules soumises à l'analyse est

	Freymann.	T	Recherches physiques.
	Guinochet.	T	Biologie végétale (S.P.C.N.) (Orsay).
	Roch.	T	Géologie.
	Schatzmann.	T	Astrophysique.
	Termier.	T	Géologie générale.
	Zamansky.	T	Mathématiques générales.
	Lucas.	T	Géologie.
	Allard.	T	Chimie physique.
	Berthelot.	T	Physique des particules fondamentales (Orsay).
	Bricard.	T	Météorologie et physique de l'atmosphère (Orsay).
Mme	Albe-Fessard.	T	Psycho-physiologie.
	Friedel.	T	Physique des solides (Orsay).
	Julia M.	T	Etudes des moléculaires naturelles complexes.
	Lender.	T	Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay).
	Magat.	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle	Quintin.	T	Electrochimie.
	Monod.	T	Chimie du métabolisme.
	Benoit.	T	Physio. animale (Orsay).
	De Possel.	T	Analyse numérique.
	Charlot.	T	Chimie analytique.
	Lemée.	T	Ecologie végétale (Orsay).
	Guérin.	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay).
	Chatelet.	T	Chimie (P.C.B.).
	Jean.	T	Physique nucléaire (Orsay).
	Mattler.	T	Physique (S.P.C.N.).
	Bergerard.	T	Zoologie (Orsay).
	Bertein.	T	Electronique (Orsay).
	Bouissières.	T	Radiochimie.
Mme	Couture.	T	Thermodyn. et mécan. phys.
MM.	Ellemberger.	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
	Franc.	T	Biologie animale (P.C.B.).
	Schnell.		Botanique tropicale.
	Stlkowski.	T	Physiologie végétale.
	Acher.	T	Chimie biologique.
	Baudoin.	T	Biologie animale (P.C.B.).
	Beaumont.		Biologie animale (S.P.C.N.).
	Blamont.		Géophysique ionosphère.
	Boureau.	T	Botanique.
	Curie D.		Physique (M.G.P.).
	Durand-Delga.	T	Géologie.
	Fréon.	T	Chimie organique (Orsay).
	Heller.	T	Physiologie végétale.
	Tortrat.	T	Calcul des probabilités.
	Cailleux.	T	Géologie (S.P.C.N.).
	Magnan.		Physique électricité.
	Daudel.	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la physique nucléaire.
	Rollet.	T	Chimie minérale.
Mlle	Josien.	T	Chimie (S.P.C.N.).
MM.	Chevalley.	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
	Arnoult.	T	Electronique (Orsay).
	Chapelle.	T	Physique I (Orsay).
	Delange.	T	Mathématiques I (Orsay).
	Deny.	T	Mathématiques générales.
	Germain.	T	Mécanique théorique des fluides.
	Lacombe.	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
	Brochard.	T	Physique (M.C.P.) (Orsay).
	Cabannes.	T	Mécanique générale.
	Lesieur.	T	Mathématiques I (Orsay).
	Mazet.	T	Mécanique générale (Orsay).
	Caire.		Géographie phys. et géol. dynamique.
	Comolet.		Mécanique des fluides.
	Corabœuf.	T	Physio. animale (Orsay).
	Delloue.	T	Physique de l'exosphère.
	Gorenflot.		Botanique II (Orsay).
	Houillon.		Biologie animale (P.C.B.).
	Jullien J.		Chimie (S.P.C.N.) (Orsay).
	Malgrange.	T	Techniques math. de la phys. (Orsay).
	Olivier.		Anthropologie.
	Prévost G.		Biologie végétale (C.P.E.M.).
	Favard.		Biologie animale (C.P.E.M.).
	Nozeran.	T	Botanique II (Orsay).
	Blanc-Lapierre.	T	Physique (E.N.S.) (Orsay).
	Chevaugeon.	T	Botanique (Orsay).
	Kahane.	T	Mathématiques (Orsay).
	Samuel.	T	Math. (E.N.S.) féminines.
	Kourganoff.	T	Astronomie (Orsay).
	Thiry.	T	Mécanique céleste.
	Abeles.		Physique (S.P.C.N.).
	Amat.	T	Physique (P.C.B.).
		T	Géologie.
Mme	Benoist-Gueutal.	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
MM.	Bougis.		Biologie marine Villefranche-sur-Mer.
	Bruhat.	T	Mathématiques (M.P.C.).
	Brunn.	T	Géologie historique (Orsay).
	Chabral.	T	Physique (M.G.P.) (Orsay).
	Deheuvels.	T	Mathématiques propédeutique.
	D'Espagnat.	T	Physique théorique (Orsay).
	Furon.	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme	Gans.	T	Génétique.
MM.	Geneves.		Biologie végétale (P.C.B.).
	Guilbert.		Physique (C.S.U.) Orléans.
	Hupe.	T	Pétrographie.
	Hollande.	T	Biologie générale.
	Lions.	T	Analyse numérique.
	Maitte.	T	Chimie (P.C.B.).
	Meyer.		Physique propédeutique.
	Nicolas.		Géologie appliquée.
	Paginel.		Biologie générale.
Mlle	Fourcroy.		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme	Choquet-Bruhat.	T	Mécanique analytique et mécanique céleste.
Mlle	Veil.	T	Physiologie générale.
MM.	Lwoff.	T	Microbiologie.
	Siestrunck.	T	Mécanique physique et expérimentale.
	Néron.	T	Mathématiques (M.P.C.) (Orsay).
Mme	Pecker-Wimel.	T	Astrophysique.
MM.	Balkansky.		Physique (M.P.C.).
	Le Corre.	T	Electricité.
	Delcroix.	T	Physique théorique (Orsay).
	Gourdin.		Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
	Lehmann.	T	Physique expérimentale des hautes énergies.
	Nataf.	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
	Echalier.		Biologie animale (P.C.B.).
	Barraud.		Physiologie cellulaire.
	Lioret.	P	Physiologie végétale (Orsay).
	Dars.		Géologie structurale et géologie appliquée.
	Camefort.	T	Botanique (agrégation).
	Vichniewsky.	T	Mécanique industrielle.
	Blaquière.		Electronique (Orsay).
	Arnous.	T	Physique théorique.
	Tatibouet.		Chimie (C.S.U., Orléans).
	Malliavin.	T	Mathématiques propédeutiques (Orsay).
	Gaudemar.		Chimie propédeutique.
	Perez y Jorba.		Physique expérimentale des hautes énergies (Orsay).
	David.	T	Chimie (agrégation Orsay).
	Brousse.	T	Mécanique théorique.
	Rosch.	T	Astronomie.
	Guy.	T	Physique expérimentale.
	Lazard.		Mathématiques (M.P.C.).
	Morel Pierre.		Physique (M.P.C.).
	Arsac.		Programmation.
	Lefebvre.		Chimie (M.P.C.).
	Chapeville.		Biochimie.
	Benoit.		Physique (C.P.E.M.).
	Rio.		Chimie (C.P.E.M.).
	Jauzelin.		Géologie (E.N.S.).
	Jancovici.	T	Mathématiques.
	Hervé.		Physique atomique (Orsay).

	Vilkas.	Chimie (C.P.E.M.).		Falk-Vairant.	Physique nucléaire.
Mlle	Ficini.	Chimie (C.P.E.M.).		Fetizon.	Chimie propédeutique.
MM.	Lequeux.	Astronomie.		Cerf.	Mathématiques (Orsay).
	Cohen-Tannoudji.	Physique (M.P.C.).		Pascaud.	Physiologie.
	Tavernier.	Physique (C.P.E.M.).	Mme	Petit.	Géologie (Orsay).
Mme	Roizen.	Physique (C.P.E.M.).	MM.	Brousse.	Biologie animale (C.P.E.M.).
MM.	Durand M.	Biologie animale (S.P.C.N.).		Cagnac.	Physique agrégation (Orsay).
	Ravier.	Pétrographie.		Leberre.	Zoologie (Orsay).
	Roseau.	T Mécanique théorique des fluides.		Schaeffer.	Microbiologie (Orsay).
	Roubine.	Electronique.		de Gennes.	Physique des solides (Orsay).
	Silber.	T Chimie (P.C.B.).		Riou.	Physique nucléaire expér. (Orsay).
	Uebersfeld.	T Electronique.		Clauser.	Chimie biologique (Orsay).
	Yvon.	T Théories physiques.		Chevalier.	Physiologie animale (Orsay).

Le Secrétaire général

R. Poullain.

A notre maître et directeur de recherches,

Monsieur le Professeur J. HAMBURGER.

Thèse de Paris 1965

Centre de recherche sur l'insuffisance rénale
(Professeur M. J. HAMBURGER, Hôpital Necker, Paris)

et

Laboratoire de physique des solides
(Professeur M. R. CASTAING, Faculté des Sciences de Paris, Centre d'Orsay, S.-et-O.)

ANALYSE CHIMIQUE PONCTUELLE DES INCLUSIONS INTRACELLULAIRES PAR SPECTROGRAPHIE DES RAYONS X. APPLICATION A L'ÉTUDE DES CELLULES RÉNALES

Cette étude a été effectuée dans le Centre de recherche sur l'insuffisance rénale chez M. le Professeur J. Hamburger, à l'hôpital Necker, et dans le laboratoire de physique des solides de la Faculté des sciences de Paris, Centre d'Orsay, chez M. le Professeur R. Castaing.

M. le Professeur A. Monnier nous fait le très grand honneur de présider notre thèse. Qu'il nous soit permis de lui exprimer ici nos remerciements pour les encouragements constants qu'il nous a toujours prodigués et l'orientation déterminante qu'il a fait prendre à nos études.

Je suis très reconnaissant à M. le Professeur R. Castaing qui nous a permis l'accès de son laboratoire. Les conseils que nous avons pu y recueillir sous sa haute autorité nous ont été extrêmement précieux. Que M. Ali el Hili et M. Lucien Henry trouvent ici l'expression de notre gratitude.

Je remercie vivement M. le Professeur A. Dognon pour l'intérêt dont il a honoré nos recherches.

donc : $\frac{280.10^6 \times 3{,}14}{38{,}36} = 22{,}8.10^6$ molécules. Chacune de ces molécules contenant quatre atomes de fer de poids atomique 56, la masse du fer soumise à l'analyse est donc $\frac{22{,}8.10^6 \times 4 \times 56}{6{,}02.10^{23}} = 0{,}8.10^{-14}$ g.

Une masse aussi faible que $0{,}8.10^{-14}$ g est donc décelable très aisément et on peut prévoir que des quantités de matière beaucoup plus faibles peuvent encore être analysées.

Précisons ici que, dans l'exemple choisi, la distribution du fer est homogène dans tout le volume analysé. Si la masse de fer décelée ($0{,}8.10^{-14}$ g) avait été concentrée à l'intérieur de ce volume sous forme d'une très petite parcelle de métal pur, la sensibilité n'aurait pas été notablement modifiée. Il est intéressant de préciser alors quel serait le volume occupé par cette masse de métal. La densité du fer étant 7,86, le volume occupé par $0{,}8.10^{-14}$ g est environ : $V = \frac{0{,}8.10^{-14}}{7{,}86} = 10^{-15}$ cm^3, soit un millième de micron cube. *Il est donc possible d'effectuer l'analyse de particules dont les dimensions sont bien inférieures à la limite de résolution du microscope à lumière* ; nous en verrons des exemples.

2. L'analyse quantitative

Voyons successivement les principes de l'analyse quantitative, puis les difficultés rencontrées par ses applications en biologie.

A) Les bases de l'analyse quantitative ont été posées par R. Castaing (10). La méthode consiste à comparer les intensités respectives d'une raie spectrale caractéristique d'un élément, obtenue en un point donné de la préparation, avec la même raie spectrale du même élément obtenue à partir d'un échantillon témoin dont on connaît exactement la composition chimique.

Pour cela, le spectrographe est d'abord réglé sur une raie caractéristique intense de l'élément que l'on veut doser dans le petit volume de l'échantillon analysé. La sonde étant dans un premier temps centrée sur ce petit volume, on fait un comptage du nombre d'impulsions données par le compteur, par unité de temps. Dans un deuxième temps, la sonde est dirigée sur l'échantillon témoin constitué généralement par l'élément à l'état pur, puis on fait un deuxième comptage dans les mêmes conditions, c'est-à-dire sans modifier le réglage du faisceau d'électrons, ni celui du spectrographe. Il est donc possible de comparer les intensités d'une même radiation caractéristique émise successivement, et dans les mêmes conditions par la matière analysée et par l'échantillon témoin. Les rayonnements dont on compare les intensités ont la même longueur d'onde, et R. Castaing a pu montrer qu'il était possible dans ces conditions, d'obtenir avec une bonne approximation la concentration de l'élément au point analysé : appelons I_A l'intensité de la raie $K\alpha_1$ des rayons X émis par l'échantillon dont on veut déterminer la concentration massique de l'élément A, et I (A) l'intensité dans la même raie $K\alpha_1$ des rayons X émis dans les mêmes conditions par l'élément A à l'état pur ; on peut démontrer alors, que la concentration massique C de l'élément A dans la région analysée peut être donnée par une relation très simple, valable en première approximation :

$$\frac{I_A}{I\,(A)} = C_A$$

La validité de cette relation peut être démontrée théoriquement en négligeant un certain nombre de facteurs correctifs, que nous envisagerons par la suite.

Le long de sa trajectoire dans l'échantillon, l'électron va perdre progressivement son énergie cinétique initiale $E_o = eV_o$ (V_o étant la tension accélératrice du faisceau). Cette énergie E est fonction du trajet x parcouru depuis le point d'impact. Soit n_K le nombre d'électrons de la couche K de l'élément A présents par centimètre cube dans l'échantillon, et $E_K = eV_K$ l'énergie minimum d'ionisation de la couche K de cet élément. Le nombre d'électrons arrachés de cette couche K sur le trajet dx est :

$$dn = \Phi\,(E, E_K, n_K)\,dx$$

Φ étant la fonction d'ionisation.

Soit ρ la densité de la région analysée, A la masse atomique de l'élément A et ψ_A une fonction ne dépendant que des caractéristiques de l'élément A. On peut alors écrire :

$$dn = \frac{\rho\, C_A}{A} \frac{\psi_A\,(E)\,dE}{\frac{dE}{dx}}$$

Si on admet, en première approximation la loi de ralentissement de l'électron de Williams (50).

$$\frac{dE}{dx} = 1{,}69.10^{-9}\,\rho\,\beta^{-1{,}4}$$

$\beta = \frac{v}{c}$ n'étant fonction que de l'énergie E de l'électron, on peut écrire :

$$dn = \frac{C_A}{A} f_A\,(E)\,dE$$

la fonction f_A ne dépendant que des caractéristiques de l'élément A. Le nombre total d'ionisations créées sur la couche K de l'élément A, sur la totalité de la trajectoire est alors :

$$n = \frac{C_A}{A} \int_{E_o}^{E_k} f_A\,(E)\,dE$$

Le nombre n' d'ionisations créées dans l'élément A pur par le même électron étant

$$n' = \frac{1}{A}\int_{E_o}^{E_k} f_A(E)\, dE$$

Le rapport $\frac{I(A)}{I_A}$ des intensité respectives des rayons X émis dans la raie Kα de l'élément pur et de l'échantillon témoin est égale au rapport $\frac{n}{n'}$ des nombres d'ionisations créées par un électron.

On démontre ainsi la relation cherchée, valable en première approximation :

$$\frac{I_A}{I(A)} = C_A$$

Si on émet en seconde approximation, la loi de ralentissement des électrons proposée par Webster (49) qui s'écrit pour l'élément pur A de nombre atomique Z_A

$$\frac{dE}{dx} = 1{,}69.10^{-9}\ \beta^{-1,4}\ \rho_A \frac{2\ Z_A}{A}$$

et devient l'anticathode complexe :

$$\frac{dE}{dx} = 1{,}69.10^{-9}\ \beta^{-1,4}\ 2\rho \sum \frac{c_i\ Z_i}{A_i}$$

Si on désigne par n_i le nombre d'atomes A_i par centimètre cube dans l'échantillon, et c_i leur concentration, le même calcul conduit à la relation :

$$\frac{I_A}{I(A)} = \frac{C_A \dfrac{Z_A}{A}}{\sum c_i \dfrac{Z_i}{A_i}}$$

et les approximations envisagées peuvent alors s'écrire

$$\frac{I_A}{I(A)} = \frac{n_A A}{\Sigma\ n_i\ A_i}$$

$$\frac{I_A}{I(A)} = \frac{n_A\ Z_A}{\Sigma\ n_i\ Z_i}$$

La démonstration théorique de ces formules néglige un certain nombre de facteurs, dont il faudra tenir compte dans la pratique pour apprécier la concentration massique. Envisageons brièvement ces différents facteurs.

1) Le calcul suppose que la trajectoire de l'électron, ou tout au moins que la portion de la trajectoire où l'électron a une énergie supérieure à l'énergie d'ionisation de la couche K de l'élément analysé, est entièrement comprise dans l'échantillon. Ceci n'est pas entièrement exact étant donné l'existence d'électrons rétrodiffusés. Ce facteur tend à augmenter la concentration apparente des éléments lourds, et agit ainsi en sens inverse du facteur $\frac{Z}{A}$ de l'équation de Webster. Cet effet de compensation explique le fait que la validité des calculs de première approximation qui établit une loi de stricte proportionnalité entre l'émission et la concentration est souvent, en fait, bien meilleure que prévue.

2) Deux autres facteurs non encore envisagés interviennent en pratique. Ces facteurs sont dus au fait que l'intensité mesurée par le compteur (intensité émergente) diffère notablement de l'intensité primaire engendrée par les atomes de l'anticathode. Pour déduire de l'intensité émergente, l'intensité primaire engendrée directement par les électrons du faisceau, les deux corrections suivantes doivent être introduites :

a) *Correction d'absorption.*

La radiation caractéristique primaire engendrée est absorbée en partie dans l'anticathode elle-même. Il convient donc de tenir compte de ce phénomène qui tend à diminuer le flux émergent. L'importance de cette absorption dépend, en particulier, de la longueur d'onde de la radiation émise, de la densité ρ de la substance analysée, et de l'angle d'émergence θ du faisceau X dans la direction du compteur.

Soit I l'intensité qu'enregistrerait le compteur dans la raie K α de l'élément A si l'absorption du rayonnement dans l'anticathode n'existait pas, et dI la fraction de cette intensité émise par une couche infiniment mince dz située à la profondeur z, au-dessous de la surface de l'anticathode. Exprimons les épaisseurs en densité superficielle z (masse par unité de surface), et écrivons :

$$dI = \varphi_A(\rho z)\ d(\rho z)$$

La fonction φ_A représente la répartition en profondeur de l'émission caractéristique A k α dans une anticathode formée de l'élément A et soumise à un bombardement électronique normal de tension accélératrice V. Si on négligeait l'absorption des rayons X dans l'anticathode, le spectrographe enregistrerait donc l'intensité :

$$I = \int_0^\infty \varphi_A(\rho z)\ d(\rho z)$$

En fait il faut tenir compte du coefficient d'absorption massique $\frac{\mu}{\rho}$ du rayonnement A k α dans l'anticathode ; l'intensité réelle enregistrée est alors donnée par la relation :

$$I' = \int_0^\infty \varphi_A(\rho z)\, e^{-\frac{\mu}{\rho}\rho z \operatorname{cosec}\theta}\, d(\rho z)$$

à partir de laquelle on pourra déduire l'intensité engendrée I.

Remarque :

La détermination de la correction d'absorption exige la connaissance exacte de la fonction $\varphi_A(\rho z)$ représentant la répartition en profondeur de l'émission X

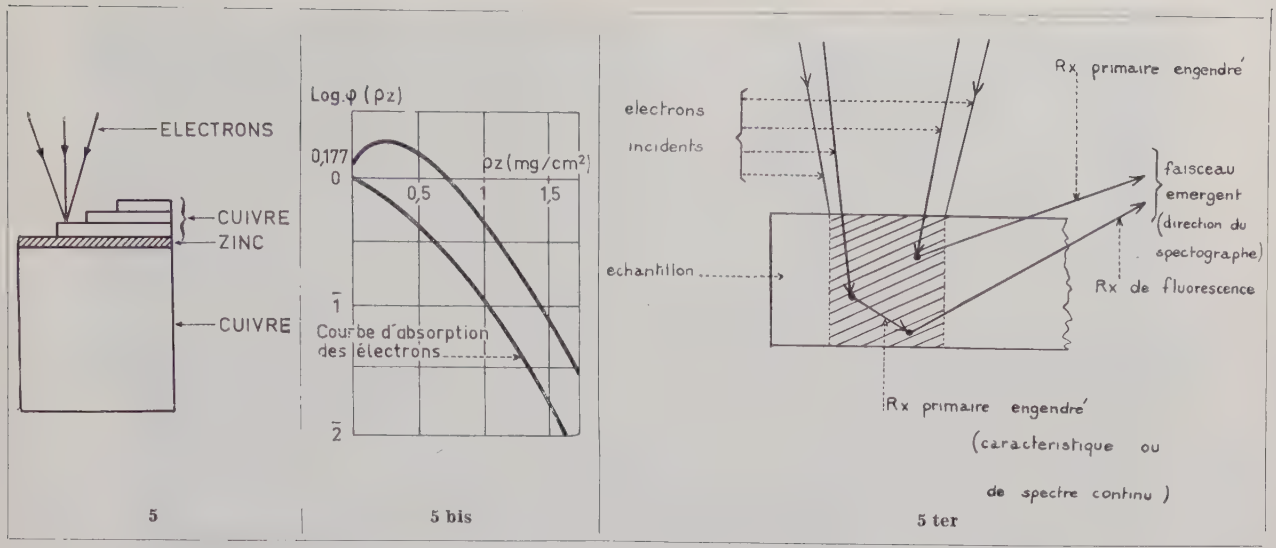


FIG. 5. — Montage de R. CASTAING et L. DESCAMPS effectué pour étudier la répartition en profondeur de l'émission X dans l'anticathode.
FIG. 5 bis. — Répartition en profondeur de l'émission X (ZnKα) dans une anticathode de cuivre.
FIG. 5 ter. — Radiations caractéristiques dans le faisceau émergent : on distingue d'une part les photons primaires engendrés directement par les électrons incidents, et, d'autre part, les photons de fluorescence émis par effet photo-électrique secondaire.

dans l'anticathode. Cette fonction a été étudiée expérimentalement par R. Castaing et L. Descamps (11).

Donnons ici simplement le protocole expérimental, et les résultats de cette étude d'où il ressort trois considérations pratiques importantes. La répartition en profondeur de l'émission de la radiation caractéristique K α du zinc, a été étudiée en déposant sur un bloc de cuivre une couche de zinc ayant une épaisseur constante dz, et en recouvrant secondairement celle-ci d'une couche de cuivre d'épaisseur croissante (fig. 5).

La courbe représentant la répartition en profondeur de l'émission X (Zn K α) dans l'anticathode de cuivre est figurée sur la figure 5 bis. L'observation de cette courbe suggère les trois remarques suivantes :

1° La courbe ne part pas de 0 à l'origine, ce qui signifie que l'émission de la couche de zinc isolée dans l'espace est inférieure à l'émission d'une même couche de zinc d'égale épaisseur déposée sur le bloc de cuivre. Cela tient surtout au fait que certains électrons, après avoir traversé une première fois la couche de zinc, viennent la retraverser une deuxième fois en sens inverse après avoir été rétro-diffusée par le bloc de cuivre sous-jacent.

2° La fonction φ_{cu} commence à croître paradoxalement aux faibles profondeurs. Le fait de recouvrir le zinc d'une mince couche de cuivre augmente l'émission caractéristique du zinc (bien qu'un certain nombre des électrons incidents aient été absorbés par le cuivre). R. Castaing et J. Descamps ont montré que ce phénomène était essentiellement dû à la diffusion des électrons par la mince couche de cuivre.

3° Une fois le régime de diffusion complète établi, la décroissance de la fonction φ_{cu} devient à peu près exponentielle, et de la forme $e^{-\sigma\rho z}$, le coefficient σ étant voisin du coefficient d'absorption massique de Lenard pour des électrons de même énergie.

b) *Une correction dite de fluorescence.*

Cette correction tient compte du fait que les photons caractéristiques proviennent non seulement de l'ionisation directe des atomes par les électrons du faisceau, mais également de l'ionisation indirecte de ces mêmes atomes par effet photo-électrique : les rayons X émis dans le volume bombardé (qu'il s'agisse des raies caractéristiques ou du spectre continu) sont en effet susceptibles, de même que les électrons du faisceau, d'arracher les électrons des atomes présents dans ce même volume (effet photo-électrique), il s'ensuit l'émission de photons caractéristiques dits de fluorescence qui vont s'ajouter dans la raie spectrale à ceux de l'émission primaire. La figure 5 ter représente schématiquement ce phénomène. Sans insister dans le détail, précisons simplement ici que l'importance de l'émission de fluorescence, variable suivant les conditions de l'examen, dépend de plusieurs facteurs dont, en particulier, la longueur d'onde de la radiation analysée, la composition de l'anticathode, l'environnement du volume soumis au bombardement électronique et la résolution du spectrographe.

3) *Un dernier facteur correctif, tenant compte du temps mort du compteur et du fond continu* doit être enfin envisagé, en particulier dans les cas où la concentration de l'élément analysé est faible.

Lorsqu'on tient compte de ces différentes corrections, dont les deux plus importantes concernent les phénomènes d'absorption et de fluorescence, la précision est en moyenne de l'ordre de 1 %.

B) DIFFICULTÉS PRÉSENTÉES PAR L'ANALYSE QUANTITATIVE SUR DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES.

Les structures biologiques homogènes (les inclusions analysées par exemple) sont habituellement très petites : à l'échelon cellulaire, un micron cube est déjà un volume important, et les structures trop petites ne se prêtent

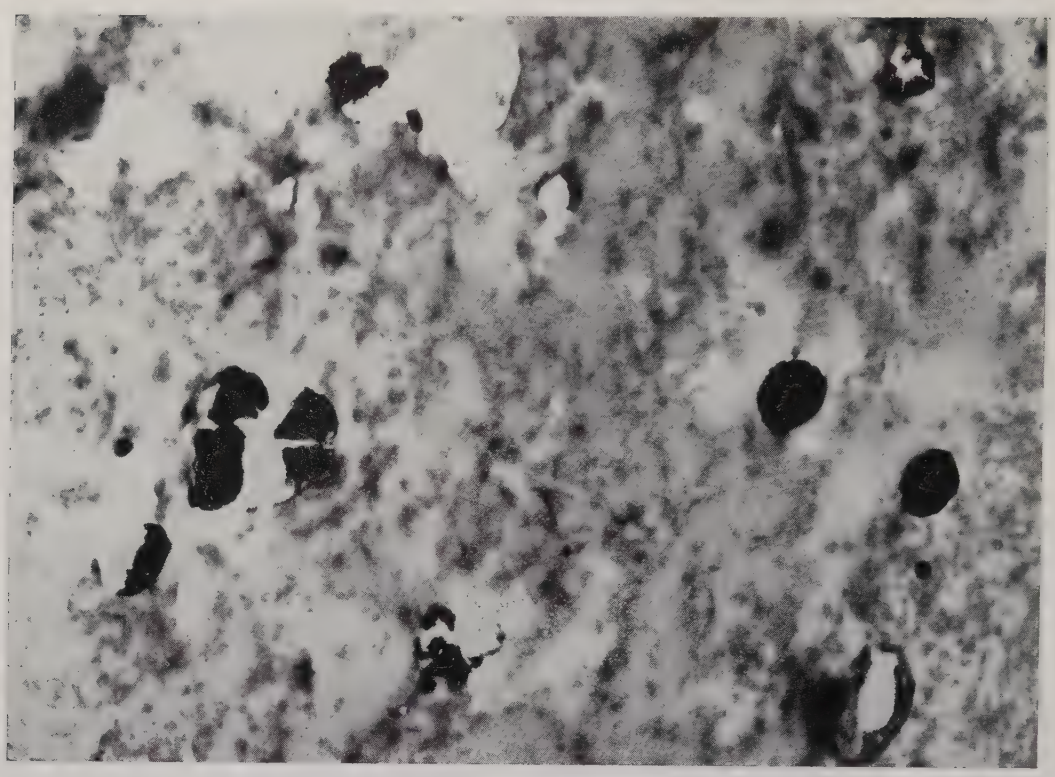


FIG. 6. — Micrographie électronique : microcristaux d'hydroxyapatite présents dans la paroi d'une artère coronaire d'un malade diabétique (prélèvement d'autopsie).

pas à l'analyse quantitative par rayons X telle que nous venons de l'envisager. Pour apprécier la concentration massique d'une matière contenue dans une inclusion, il est évidemment nécessaire que le volume analysé soit au moins égal au volume bombardé et, de façon plus précise, que les électrons du faisceau soient absorbés en majorité par l'inclusion que l'on désire analyser. Le dosage des éléments décelés ne peut donc être effectué suivant les méthodes décrites précédemment que dans les cas où l'élément analysé est disséminé de façon homogène dans un volume relativement grand (dosage du calcium ou du phosphore dans le tissu osseux, dosage du soufre dans un glomérule hyalinisé). Dans le cas le plus fréquent des petites inclusions il est seulement possible d'avoir une appréciation semi-quantitative.

Dans le cas particulier des inclusions, même petites, contenant plusieurs éléments analysables, il est possible par contre d'apprécier avec précision le pourcentage respectif des éléments présents. Ce rapport peut aider à préciser la constitution moléculaire de l'inclusion.

Remarquons pour terminer qu'on peut distinguer dans les tissus deux sortes d'inclusions minérales ; une première sorte est constituée par des inclusions cristallines (oxalate de calcium monohydraté des oxaloses, hydroxyapatite de l'artériosclérose) ; la composition chimique de celles-ci est évidemment bien définie ; une deuxième sorte d'inclusion comprend celles dans lesquelles l'élément minéral est uni à la matière organique sous forme de complexes dont la composition peut être très variable : il s'agit généralement d'organites intracellulaires (vacuoles, « corps denses aux électrons », mitochondries), accumulant progressivement ces complexes minéraux. Pour de telles inclusions il est évident qu'un dosage de l'élément minéral perd beaucoup de son intérêt puisqu'il est effectué sur un ensemble (l'inclusion) dont la constitution est à la fois hétérogène et variable au cours du temps.

3. Analyse par " balayage " : possibilité d'obtenir des images représentant la répartition topographique des éléments

Lorsqu'on a pu déterminer la constitution atomique des éléments présents dans un échantillon il est possible de déterminer leur répartition topographique ; pour cela, il suffit de régler à l'avance le spectrographe sur la longueur d'onde caractéristique correspondante au corps recherché et, grâce à un dispositif automatique de balayage (39), de soumettre alors une surface déterminée de l'échantillon à une exploration systématique par le faisceau. On obtient ainsi des images représentant la répartition topographique des éléments. La figure 6, prise au microscope électronique, met en évidence un certain nombre de petits cristaux arrondis

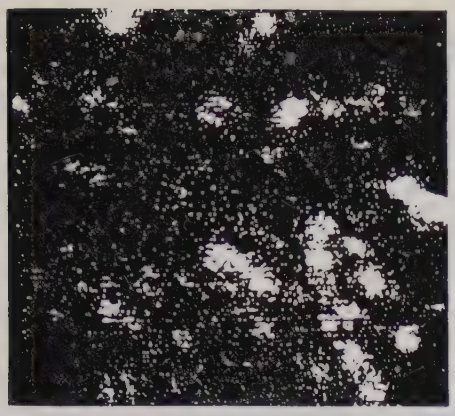


FIG. 7. — Exploration point par point d'une partie de la coupe semi-fine contenant les microcristaux représentés sur la figure 6. L'élément recherché est ici le calcium. Les points isolés correspondent au bruit de fond ; les taches (association de points) correspondent aux éléments contenant du calcium.

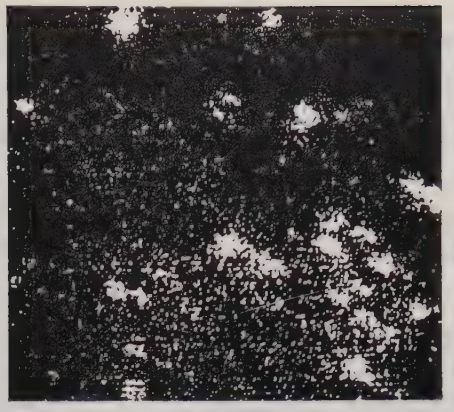


FIG. 8. — Exploration point par point de la même surface de coupe, l'élément recherché étant ici du phosphore. Les taches brillantes correspondent aux éléments contenant du phosphore. On remarque que les deux figures sont superposables.

dont le diamètre est de l'ordre de grandeur du micron. Ceux-ci correspondent aux calcifications des parois d'une artère coronaire prélevée post mortem chez un malade diabétique. L'étude de ces calcifications par diffraction des rayons X nous a montré qu'il s'agissait là de cristaux d'hydroxyapatite. Ces cristaux contiennent entre autres les éléments calcium et phosphore. Les photographies 7 et 8 montrent les résultats obtenus par balayage d'une surface de coupe épaisse de un micron et contenant ces microcristaux. Les points isolés correspondent au bruit de fond des compteurs. Les taches (association de points) apparaissent à l'emplacement de chaque cristal. La figure 7 montre la distribution du calcium ; la figure 8 montre la distribution du phosphore. On remarque que les deux figures sont exactement superposables.

CHAPITRE IV

APPLICATIONS BIOLOGIQUES DE LA MÉTHODE D'ANALYSE PONCTUELLE

Dans l'état actuel de nos connaissances sur la structure et la nature des organites intra-cellulaires, il est difficile de préciser quels seront les principaux domaines d'application de la méthode d'analyse ponctuelle en biologie. On peut prévoir cependant que l'étude par cette technique de certains tissus sera particulièrement intéressante et permettra de préciser certains mécanismes physiologiques ou pathologiques encore mal connus. Nous pensons en particulier ici aux poumons et aux reins ; le rôle physiologique respectif de ces deux organes les exposant tout particulièrement à l'accumulation en leur sein de substances étrangères.

L'épithélium pulmonaire, étant donné sa situation, est directement exposé aux poussières atmosphériques. On sait que certaines de celles-ci sont susceptibles d'être fixées, voire absorbées par cet épithélium, et d'entraîner des lésions graves locales ou à distance, mais on connaît encore assez mal le mécanisme intime par lequel ces poussières agissent ; le lieu exact de leur action et le rôle respectif des différentes substances qu'elles contiennent ne sont pas encore clairement élucidés car on était jusqu'à présent totalement démuni de méthodes permettant de préciser « in situ » la nature chimique de ces substances. La méthode d'analyse ponctuelle trouve sans doute ici une de ses applications les plus importantes dans l'immédiat. La liste des substances dont on connaît actuellement les dangers d'absorption par voie pulmonaire (silicium, fer, étain, amiante, béryllium, aluminium) n'est d'ailleurs sans doute pas close ; nous en verrons un exemple à propos du baryum.

De même que la barrière de l'épithélium pulmonaire, dont une des fonctions est de s'opposer, entre certaines limites, à la pénétration des particules atmosphériques dans l'organisme, est directement exposée à celles-ci, de même l'épithélium rénal, dont une des fonctions est d'éliminer les substances étrangères après les avoir concentrées, est directement exposé à la toxicité de ces substances.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés ici à l'étude des cellules rénales.

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE ET MICRO-ANALYSE DES INCLUSIONS MINÉRALES INTRA-RÉNALES

Les conditions dans lesquelles peuvent s'observer des accumulations intra-rénales de substances minérales, sont très diverses : il peut s'agir d'intoxication alimentaire ou médicamenteuse, de troubles métaboliques aboutissant à la surcharge de l'organisme en certaines substances chimiques, ou encore de troubles endocriniens.

Nous avons étudié ici les conditions expérimentales suivantes chez le rat.

— Surcharge par l'ion oxalate $(COO)^{--}$
— » » » calcium Ca^{++}
— » » » phosphate PO_4H^{--}
— Intoxication par la vitamine D3
— » » le plomb
— » » le bismuth
— » » l'uranium
— » » l'aluminium.

Les quatre premières conditions expérimentales nous ont amenés à distinguer quatre types bien distincts de néphrocalcinose. On entend sous ce terme l'infiltration du parenchyme rénal par des dépôts calcaires quelles que soient la nature chimique exacte de ces dépôts ou leur circonstance d'apparition. Ces néphrocalcinoses se différencient entre elles à la fois par la localisation des dépôts calcaires, leur morphologie ultrastructurale et leur constitution chimique. Jusqu'à présent, seuls les dépôts de la première variété (oxalose) avaient été clairement distingués des autres.

1. Surcharge par l'ion oxalate $(COO)^{--}$

Cette intoxication provoque l'apparition dans le rein de petits cristaux, fortement biréfringents, qui siègent à l'intérieur du cytoplasme des cellules du tube rénal (25) et qui ressemblent en tous points à ceux observés au cours des oxaloses humaines.

Conditions expérimentales.

Le rat a été choisi comme animal d'expérience et seuls les rats mâles ont été utilisés, les femelles étant beaucoup plus résistantes à cette intoxication (44). Les rats ont reçu chaque jour pendant 10 jours, une solution intra-péritonéale d'oxalate de sodium à la dose de 10 milligrammes pour 100 grammes de poids. Une première néphrectomie fut faite le jour suivant la dernière injection. Une deuxième série de dix injections

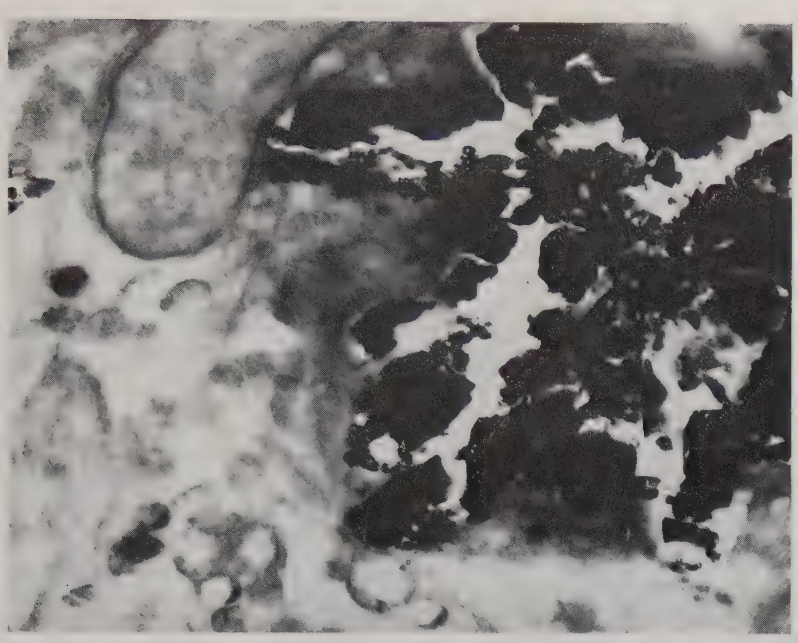


FIG. 9. — Micrographie électronique : important dépôt dans une cellule tubulaire d'un rein de rat, apparu au cours d'une surcharge en oxalate de sodium.

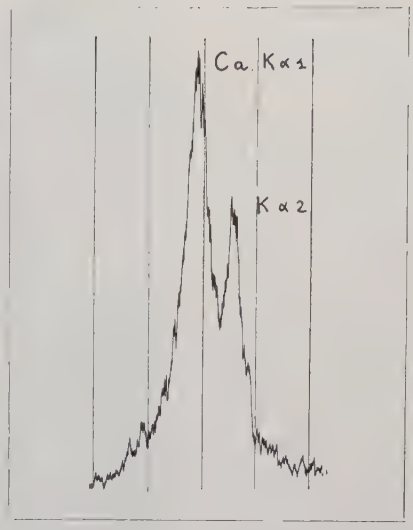


FIG. 10. — Raies $K\alpha_1$ et $K\alpha_2$ du calcium, obtenues par analyse du cristal représenté sur la figure 9.

identiques fut effectuée chez les rats ainsi néphrectomisés, et les animaux ont été sacrifiés vingt-quatre heures après la dernière injection de cette série.

RÉSULTATS.

a) *Examen au microscope optique.*

Le nombre de cristaux est faible sur les reins prélevés après la première série d'injections, un à deux cristaux seulement sont retrouvés par tranche de section du rein ; après la deuxième série d'injections, le nombre de cristaux est par contre considérable. La corticale et la médullaire sont l'une et l'autre envahies. La plupart des dépôts cristallins sont retrouvés dans les tubes, exceptionnellement dans l'interstitium et les glomérules. La forme des cristaux est variable ; certains sont polyédriques, d'autres sont très fins et allongés, en aiguilles, d'autres dessinent des images curieuses en rosaces, d'autres enfin n'ont aucune forme définie. Tous les cristaux par contre sont fortement biréfringents en lumière polarisée. Ces différents caractères laissaient présumer qu'il pouvait s'agir d'oxalate de calcium, mais aucune réaction histochimique n'était susceptible d'apporter ici la preuve directe que le cation combiné à l'ion oxalate injecté était bien du calcium.

Un très grand nombre de colorations dites spécifiques des sels de calcium sont utilisés en histologie ; citons parmi les plus courantes la méthode argentique de Kossa, la méthode aux métaux lourds de Roehl utilisant un des sels métalliques suivants : sulfate de cuivre, acétate de plomb ou chlorure de fer, la méthode de Stoelzner utilisant le nitrate de cobalt. Il s'agit là de méthodes qui peuvent se ramener à un seul schéma : le tissu est traité par un sel d'un métal lourd, celui-ci étant secondairement « révélé » par un réactif spécifique de ce métal. Ainsi que le précise Lison (29), il s'agit là de simples méthodes d'imprégnations métalliques, il ne s'agit aucunement de réactions histochimiques spécifiques et il est important d'insister sur les faits suivants : d'une part, aucune de ces méthodes n'est réellement spécifique du calcium, et, d'autre part, certains sels de calcium (les oxalates par exemple) ne donnent pas de réactions positives. Les réactions chimiques auxquelles font appel ces méthodes n'ont en effet rien à voir avec la présence de calcium, mais elles sont dues aux propriétés des substrats calcifiés ou en voie de calcification.

Toujours d'après Lison, la seule méthode permettant de mettre en évidence de façon certaine la présence d'un sel de calcium dans les tissus est la méthode de micro-incinération suivie de la réaction du gypse, mais celle-ci ne permet pas une localisation cytologique précise. D'autre part, le nombre des cristaux présents dans nos préparations était trop faible pour qu'on puisse les analyser par les méthodes de diffraction des rayons X. Nous allons voir que la méthode d'analyse ponctuelle par spectrographie des rayons X permet, par contre, de résoudre ce problème très aisément. Précisons auparavant comment se présentent ces cristaux au microscope électronique, et quelle est la localisation initiale du dépôt cristallin.

b) *Examen au microscope électronique.*

Cet examen a fourni des renseignements portant essentiellement sur la localisation initiale du dépôt cristallin (25). On observe ici que le phénomène initial de cristallisation s'effectue au sein même du cytoplasme de la cellule tubulaire et non en dehors des cellules,

c'est-à-dire dans les régions intra-cellulaires ou inter-membrano-épithéliales comme on l'avait suggéré tout d'abord (44). Par ailleurs, à l'intérieur de ce cytoplasme, la cristallisation semble s'effectuer au hasard ; aucun rapport particulier avec un quelconque organite intra-cytoplasmique n'a pu être mis en évidence ; ces cristaux ne sont pas intra-vacuolaires, aucune membrane ne les sépare du cytoplasme cellulaire adjacent. La figure 9 met en évidence un de ces cristaux.

c) *Analyse à la microsonde.*

Cette analyse a été effectuée sur des coupes d'araldite épaisses de un micron et déposées sur grille porte-objet en cuivre. Les cristaux relativement volumineux (plusieurs microns) étaient aisément repérables par le système d'observation optique de l'appareil. Dans chacun de ces cristaux, l'élément calcium a été retrouvé. La figure 10 met en évidence les raies K α_1 et K α_2, caractéristiques du calcium telles qu'elles apparaissent lors de l'analyse ponctuelle d'un cristal. Les conditions de l'analyse étaient ici particulièrement favorables, étant donné la forte teneur en calcium de ces cristaux, leurs dimensions, et la facilité avec laquelle on pouvait les mettre en évidence par le système optique de la microsonde.

2. Surcharge en ions calcium Ca^{++}

Les lésions morphologiques provoquées par la surcharge expérimentale en calcium ont été étudiées récemment au microscope électronique par Policard et ses collaborateurs (36). Les dépôts calcaires apparaissant au cours de cette néphrocalcinose sont d'un type bien particulier ; nous verrons qu'ils sont analogues dans leur ultrastructure et dans leur composition chimique, aux dépôts observés en pathologie humaine dans le cas très spécial du syndrome de Burnett.

Conditions expérimentales.

Nous avons repris la technique expérimentale utilisée par Policard et effectué l'analyse de ces dépôts. Des rats ont reçu chaque jour pendant quinze jours une injection intra-péritonéale de 1,5 cc d'une solution à 10 % de gluconate de calcium.

Résultats.

a) *Examen au microscope optique.*

Les lésions observées sont identiques à celles décrites par J. Fourman (21) : d'importants dépôts calcaires apparaissent et sont localisés dans les membranes basales de la partie proximale du néphron. Ces dépôts prennent fortement les réactions de Kossa et de Stoelzner et ne sont pas biréfringents.

b) *Examen au microscope électronique.*

L'étude de ce type de néphrocalcinose au microscope électronique faite par Policard et ses collaborateurs (36) a apporté à ces notions les précisions suivantes :

Il existe deux types de dépôts, les dépôts les plus importants siègent dans les basales des tubes proximaux ou, plus rarement, de la capsule de Bowman, leur structure est finement granulaire et ils sont disposés en couches concentriques. Un deuxième type de dépôt beaucoup plus rare est au contraire intra-cellulaire et siège en plein dans la matière cytoplasmique fondamentale des cellules glomérulaires viscérales et des tubes proximaux. La figure 11 montre l'ultrastructure d'un dépôt présent dans la membrane basale d'un tube proximal.

c) *Analyse à la microsonde.*

Cette analyse nous a permis de préciser quels étaient les éléments susceptibles de se combiner au calcium pour former ces dépôts. La forme sous laquelle se dépose le calcium dans les membranes basales est en effet inconnue bien que ce phénomène local de calcification soit extrêmement fréquent. Du calcium, du phosphore et du soufre ont été détectés. La figure 12 nous montre les radiations caractéristiques de ces trois éléments obtenus au même point d'une préparation. Le pourcentage respectif de ces trois corps est assez variable d'un dépôt à l'autre ; le calcium est présent dans chacun des dépôts, et toujours en quantité prédominante ; le phosphore est constamment retrouvé mais parfois en assez faible quantité. La présence du soufre est inconstante, la quantité présente de cet élément est généralement faible mais, dans certains cas les intensités respectives des radiations caractéristiques du soufre, du calcium et du phosphore sont identiques. Il est donc certain que le soufre entre, par place, dans la constitution des dépôts, la faible quantité de soufre entrant dans la constitution des membranes basales (celles-ci sont constituées de muco-polysaccharides contenant des groupes sulfhydriles) étant très insuffisantes à elle seule pour expliquer des intensités aussi importantes. L'inégale répartition de ces trois éléments (calcium, phosphore, soufre) montre bien qu'il ne s'agit pas là d'éléments cristallins bien définis (ces dépôts ne donnent pas d'images de diffraction électronique). Le rôle du soufre dans la précipitation des dépôts est inconnu.

3. Surcharge en ions phosphates PO_4H^{--}

Une troisième façon de réaliser une néphrocalcinose expérimentale est de provoquer une surcharge en phosphates.

Conditions expérimentales.

Nous avons utilisé pour provoquer ce type d'intoxication la technique décrite par J. Fourman (21) : des rats ont reçu chaque jour pendant quinze jours une injection intra-péritonéale de 2 cm^3 d'une solution molaire de phosphate de sodium à pH 7,4.

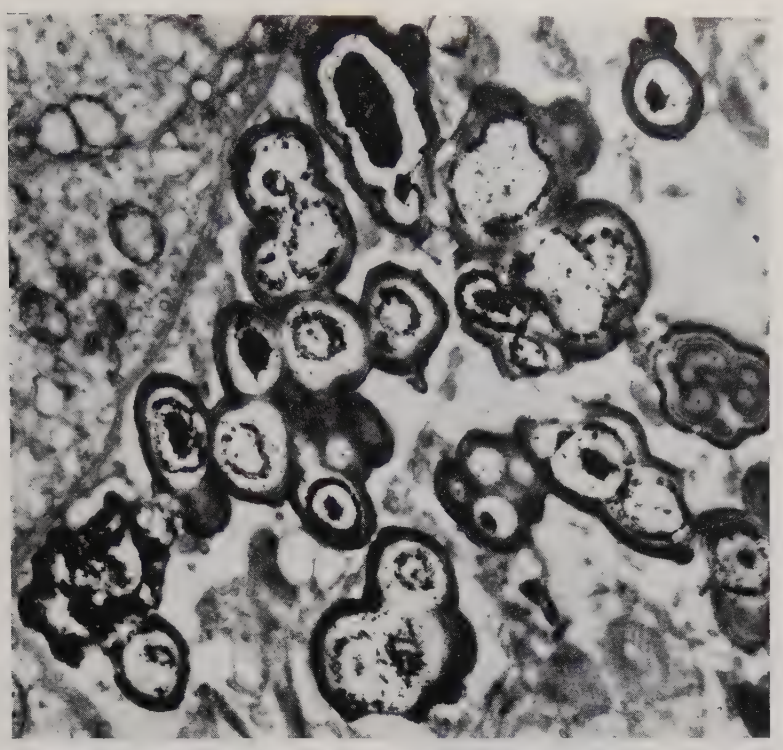


FIG. 11. — Micrographie électronique : dépôts présents dans la membrane basale d'une cellule tubulaire proximale d'un rein de rat (intoxication par le gluconate de calcium).

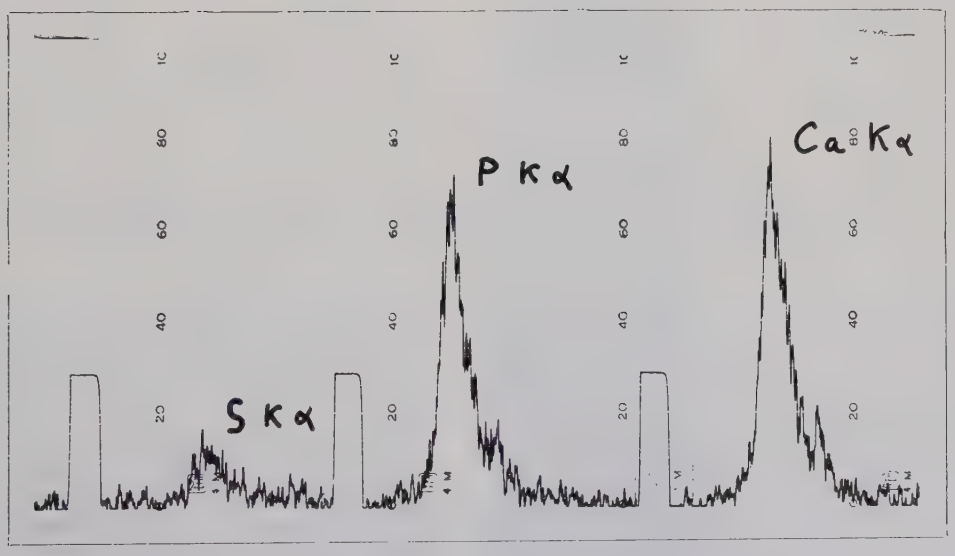


FIG. 12. — Intoxication par le gluconate de calcium : analyse ponctuelle d'un dépôt. On observe de droite à gauche les raies K α, premier ordre du soufre (λ = 5,361 K X), du phosphore (λ = 6,142 K X) et la raie K α, second ordre, du calcium (λ = 6,702 K X).

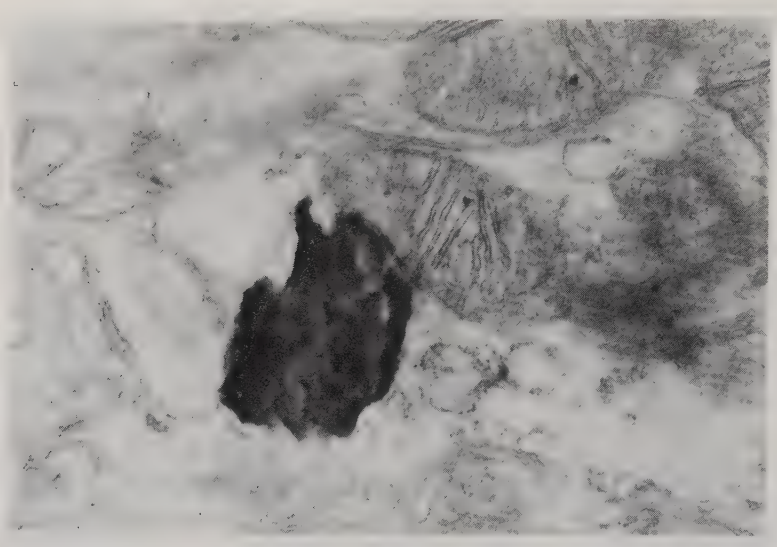


FIG. 13. — Micrographie électronique : dépôt cristallin présent dans le cytoplasme d'une cellule tubulaire rénale (intoxication par le phosphate de sodium).

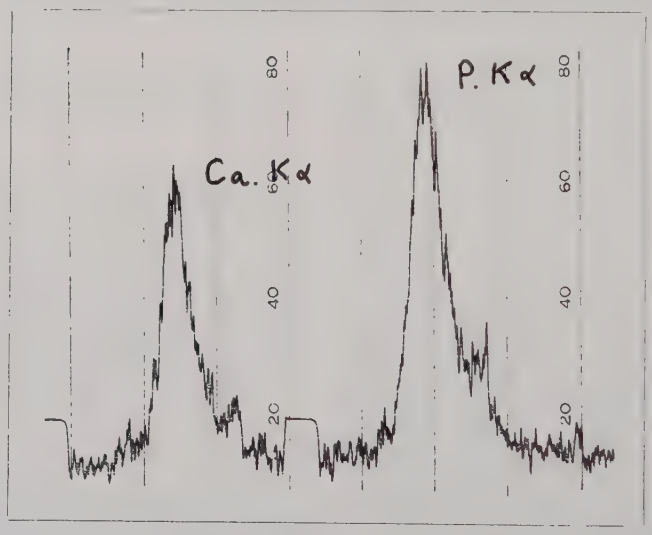


FIG. 14. — Intoxication par le phosphate de sodium : raies K α_1 du calcium (deuxième ordre), et du phosphore (1er ordre), obtenues à partir d'un des cristaux présents dans les cellules tubulaires rénales.

RÉSULTATS.

a) *Examen au microscope optique.*

L'examen au microscope optique était normal ; les colorations de Stoelzner ont toutes été négatives.

b) *Examen au microscope électronique.*

L'examen au microscope électronique par contre, nous a permis de mettre en évidence dans les cellules tubulaires, des petites inclusions intracytoplasmiques de dimensions généralement inférieures au micron, d'aspect cristallin, et dont la forte densité laissait supposer qu'il s'agissait de dépôts de nature minérale. Ces inclusions siègent dans la matrice cytoplasmique fondamentale dont elles ne sont séparées par aucune membrane (fig. 13).

c) *Analyse des inclusions.*

L'analyse nous a montré qu'il s'agit ici de phosphates de calcium (fig. 14) de composition bien définie. Le rapport de l'intensité des raies caractéristiques est identique, quel que soit le dépôt analysé ; à aucun moment, nous n'avons observé de dépôts ne contenant que du calcium bien que les données de l'histochimie avaient

Intensité I_{ca} de la raie $K\alpha_1$ (2e ordre) du calcium (en nombre de coups donnés par le compteur pendant 100 secondes).	Intensité I_p de la raie $K\alpha_1$ (1er ordre) du phosphore (en nombre de coups donnés par le compteur pendant 100 secondes).	Rapport des intensités : $R_1 = \frac{I_{ca}}{I_p}$
555	836	0,663
2585	3200	0,807
1602	2304	0,695
1007	1398	0,720
1311	1929	0,679
3010	4405	0,683
1846	2486	0,742
1012	1555	0,650
5023	7740	0,648
3982	6012	0,662

La valeur moyenne de R_1 est donc = 0,695.

semblé suggérer qu'une partie des dépôt était formée de carbonate de calcium (21). Le rapport $R_1 = \frac{I_{ca}}{I_p}$ de l'intensité I_{ca} de la radiation $K\alpha_1$ (2e ordre) du calcium sur l'intensité I_p de la radiation $K\alpha_1$ (1er ordre) du phosphore a une valeur identique (aux erreurs de comptage près) quel que soit le dépôt analysé. Les résultats obtenus à partir de l'analyse de dix cristaux différents sont reportés sur le tableau ci-dessus. Dans ce tableau, chaque ligne correspond à une valeur moyenne obtenue à partir de 5 mesures.

Les écarts observés entre les différentes valeurs de R_1 s'expliquent par le fait qu'il est nécessaire de modifier, à chaque mesure, le réglage du spectrographe et celui du compteur puisque l'on compare ici deux radiations dont les longueurs d'onde sont différentes. Ces écarts sont de l'ordre de grandeur des erreurs de mesure et on peut en conclure que les différents cristaux ont même composition chimique. Il était donc intéressant de préciser quelle était approximativement leur teneur relative en calcium et en phosphore. L'appréciation du pourcentage respectif de calcium et de phosphore peut se faire en comparant ce rapport avec celui obtenu à partir d'un échantillon témoin contenant ces deux mêmes éléments dans des proportions connues. Prenons comme témoins les micro-cristaux formant les calcifications artérielles. Il est facile d'obtenir ici une quantité suffisante de cristaux pour en déterminer exactement la composition chimique et la structure cristalline. La figure 15 est un diagramme de rayons X obtenu suivant la méthode de Debye Scherrer à partir d'une poudre de ces cristaux prélevés dans la paroi d'une artère coronaire. Ce diagramme nous a permis de préciser qu'il s'agit d'hydroxyapatite répondant à la formule : $Ca_5(PO_4)_3(OH)$. On a donc 6 atomes de phosphore pour 10 atomes de calcium. Les intensités des raies caractéristiques obtenues sur un de ces cristaux à partir des éléments calcium et phosphore sont reportées sur le tableau suivant : les mesures sont faites alternativement sur le calcium et sur le phosphore ; il est

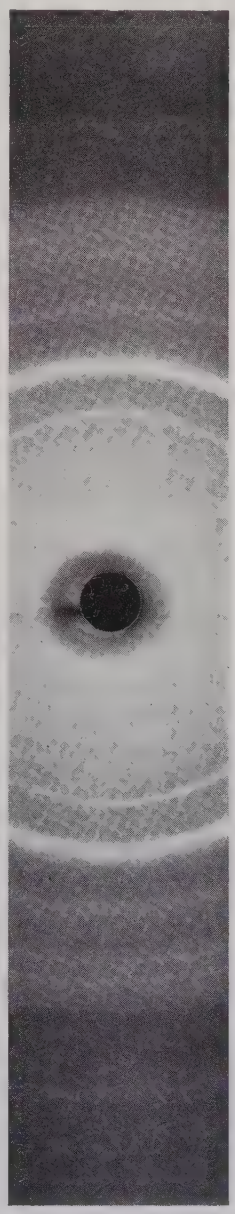


FIG. 15. — Diagramme de diffraction de rayons X suivant la méthode de Debye-Scherrer, sur une poudre cristalline obtenue à partir des dépôts calcaires présents dans une artère coronaire d'un malade diabétique. Il s'agit d'hydroxyapatite.

nécessaire en effet de modifier à chaque fois le réglage du spectrographe et celui du compteur pour obtenir une valeur moyenne ne dépendant pas d'un seul réglage.

Intensité I (Ca) de la raie $K\alpha_1$ (2^e ordre) du calcium (en nombre de coups donnés par le compteur pendant 100 secondes).	Intensité I (P) de la raie $K\alpha_1$ (1^{er} ordre) du phosphore (en nombre de coups donnés par le compteur pendant 100 secondes).
3388	2919
3685	3215
3551	2980
3455	2825
3594	3225
3207	2952
3185	2627
3518	2864
3315	2780
3532	3017
Total : 34430	Total : 29404

On a donc un nombre de coups moyen de 34430 pour la radiation $K\alpha_2$ (2^e ordre) du calcium et de 29404 pour la radiation $K\alpha_1$ (1^{er} ordre) du phosphore. Le rapport R_2 des intensités respectives de ces deux radiations caractéristiques est donc en moyenne $R_2 = \frac{34430}{29404} = 1{,}171$, ce qui correspond à un rapport de 10 atomes de calcium sur six atomes de phosphore, soit encore à un rapport de masses de $\frac{400 \text{ g de Ca}}{186 \text{ g de P}} = 2{,}15$. Pour les cristaux intra-rénaux, nous avons vu que le rapport des intensités caractéristiques est $R_1 = \frac{I_{Ca}}{I_P} = 0{,}695$. On peut donc poser, en appelant X le rapport des masses des deux éléments calcium et phosphore contenus dans ces cristaux :

$$\frac{x}{2{,}15} = \frac{R_1}{R_2} \quad \text{et} \quad x = \frac{2{,}15 \times 0{,}695}{1{,}171} = 1{,}277$$

Dans ces cristaux, 128 grammes de calcium sont donc combinés approximativement à 100 grammes de phosphore.

4. Intoxication par la vitamine D 3

Une quatrième façon de réaliser une néphrocalcinose expérimentale consiste à injecter des quantités importantes de vitamine D3. Nous allons voir que la morphologie des dépôts calcaires et leur constitution chimique sont encore différentes des précédents.

Conditions expérimentales.

Des rats de 200 grammes ont reçu 5 injections (une injection tous les deux jours) de 2,5 milligrammes de vitamine D3 (7 déhydrocholestérol), puis sacrifiés.

Résultats.

a) *Examen au microscope optique.*

L'examen au microscope optique nous a montré l'existence d'une néphrocalcinose extrêmement importante. Les dépôts siègent ici autour des tubes et prennent fortement la coloration de Stoelzner. Ils ne sont pas biréfringents. Ils présentent donc, au microscope optique, un aspect à peu près identique à celui des dépôts provoqués par la surcharge en calcium. Il existe cependant deux différences. La première est topographique. Les dépôts ne sont pas localisés ici aux pourtours des tubes proximaux, mais on en trouve de grandes quantités autour des autres portions du tubule, et notamment autour des tubes de la médullaire. La deuxième est qu'il existe ici des lésions parenchymateuses très importantes : outre les lésions des cellules tubulaires (pratiquement normales dans la néphrocalcinose par surcharge en calcium), il existe des lésions glomérulaires très importantes.

b) *Examen au microscope électronique.*

L'ultrastructure des dépôts est bien différente de celle observée au cours de la simple surcharge en calcium. Les dépôts sont formés ici par l'association de petits grains arrondis, siégeant dans les membranes basales des tubes. On ne retrouve aucune image concentrique. Lorsque le dépôt est important, les petits grains s'accolent les uns aux autres jusqu'à former des masses compactes et très denses dans lesquelles on ne retrouve aucune structure (fig. 16).

c) *Analyse à la microsonde.*

Si la présence de calcium était certaine dans ces dépôts, par contre, il n'avait pas encore été possible de déterminer sous quelle forme celui-ci était déposé (carbonate ou phosphate de calcium).

L'analyse à la microsonde permet à chaque fois de retrouver la présence de calcium et de phosphore dans des proportions bien définies (fig. 17). Le pourcentage respectif de ces deux éléments est à peu près identique à celui retrouvé dans les microcristaux d'hydroxy-apatite (120 coups pour la raie K α 1 deuxième ordre du calcium pour 100 coups pour la raie K α 1 premier ordre du phosphore). Notons cependant que la morphologie des cristaux est très différente dans les deux cas.

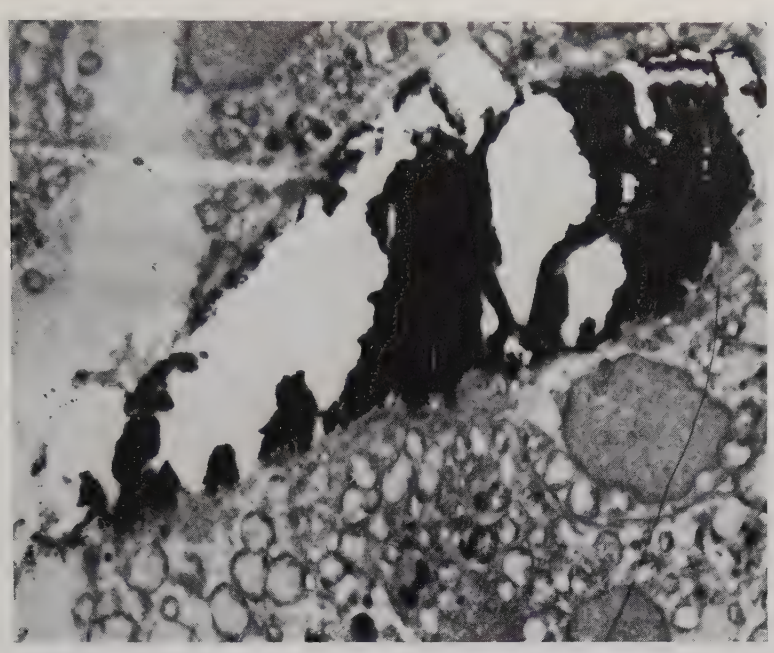


FIG. 16. — Micrographie électronique : énorme dépôt calcaire présent dans la membrane basale d'un tube rénal chez un rat ayant reçu des doses importantes de vitamine D.

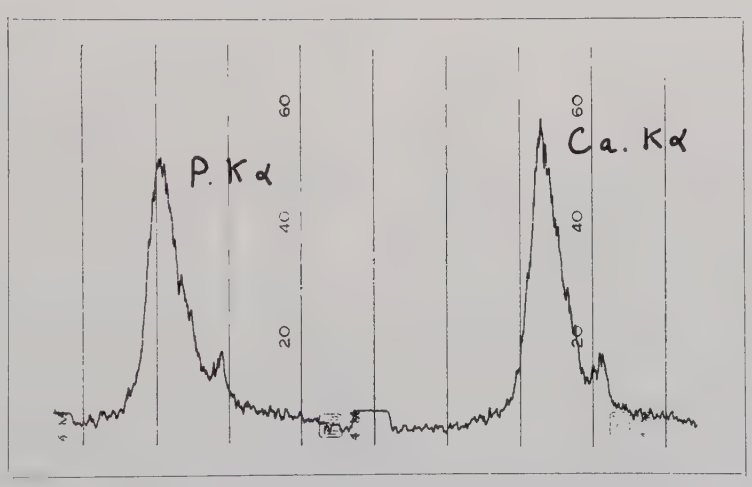


FIG. 17. — Intoxication par la vitamine D : raies K α_1 du calcium (deuxième ordre), et du phosphore (premier ordre), obtenues à partir du dépôt représenté sur la figure 16.

5. Intoxication chronique par le plomb

Au cours de l'intoxication chronique par le plomb, on observe aussi bien chez l'homme que chez l'animal d'expérience, des lésions rénales très particulières qui affectent électivement la cellule tubulaire proximale. Dans cette cellule apparaissent deux sortes de dépôts : les uns sont intranucléaires, les autres intra-cytoplasmiques.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

Des rats ont été soumis à une intoxication chronique par le plomb pendant une durée variant de 3 à 18 mois. L'intoxication est effectuée par voie orale en ajoutant à l'eau de boisson de l'acétate basique de plomb jusqu'à obtenir une solution à 1 % environ. Les animaux ont été sacrifiés les 3e, 6e, 12e et 18e mois.

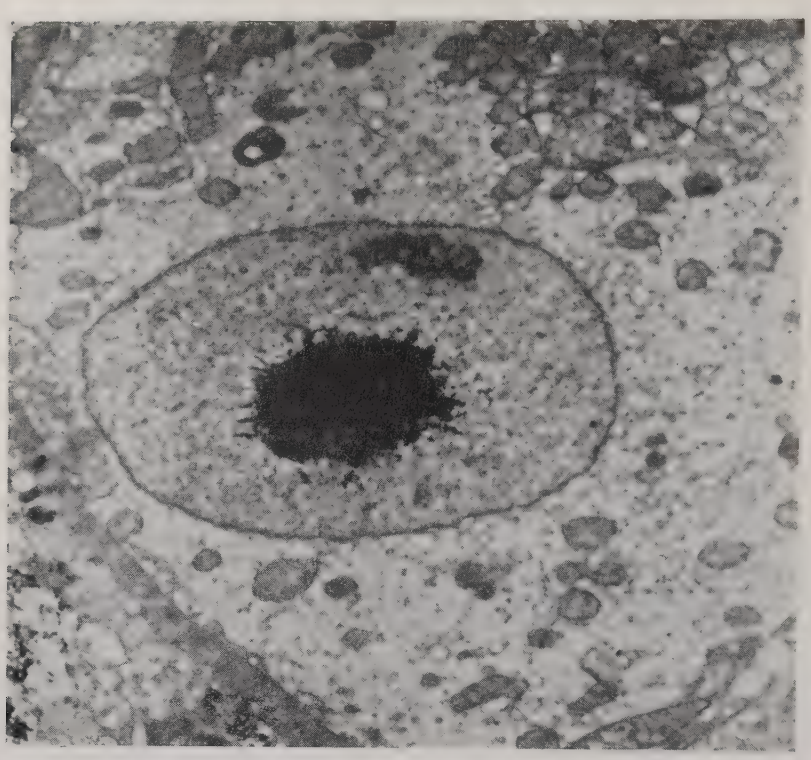


FIG. 18. — Intoxication expérimentale par le plomb. La figure met en évidence une inclusion intranucléaire caractéristique.

RÉSULTATS.

a) *Examens au microscope optique.*

Cet examen nous a permis de retrouver les inclusions intranucléaires décrites par Blackman. Il s'agit d'inclusions très acidophiles, Feulgen positives, et sur lesquelles les réactions histochimiques du plomb sont généralement négatives (3). Précisons tout de suite que dans des conditions expérimentales différentes (intoxication par le bismuth) ou dans certaines circonstances pathologiques (affections virales), on observe des images identiques et que ces aspects ne sont pas spécifiques.

b) *Examen au microscope électronique.*

Cet examen nous a montré qu'il existait non seulement des inclusions intranucléaires, mais également des inclusions intracytoplasmiques. Une des inclusions intranucléaires est représentée sur la figure 18. Il s'agit de dépôts très denses, et cette densité s'accroît fortement après imprégnation par les métaux lourds. Ils semblent formés par l'accumulation en désordre de fibrilles très fines et très denses, des inclusions ayant cette ultrastructure ne s'observent que dans l'intoxication chronique par le plomb. Les inclusions intracytoplasmiques (fig. 19) sont de tailles et de formes variables, généralement, elles sont très denses, mais leur contenu varie d'une inclusion à l'autre et à l'intérieur même d'une seule inclusion celui-ci peut être homogène, ou finement granulaire ; ailleurs, il dessine des images myéliniques. Ces dépôts intracytoplasmiques apparaissent à partir du 6e mois seulement et deviennent très nombreux et très importants après un an, alors que le nombre des dépôts intranucléaires ne varie plus sensiblement à partir du 6e mois.

c) *Analyse à la microsonde.*

L'analyse des dépôts intracytoplasmiques fut relativement aisée et a montré que ceux-ci contenaient une quantité importante de fer (fig. 20). L'analyse des dépôts intranucléaires fut plus délicate du fait de leur plus grande rareté et surtout parce qu'il est pratiquement impossible de les voir avec certitude sans utiliser un objectif à immersion. En certains points que nous supposons être ces inclusions sans pouvoir l'affirmer, nous avons mis en évidence des quantités importantes d'osmium (fixation osmique) et du phosphore et du soufre en très faible quantité. Par contre nous n'avons retrouvé aucune trace de plomb.

d) *Discussion.*

Problèmes posés par les inclusions intracytoplasmiques.

Bien qu'inattendue, la présence de fer dans le cytoplasme des cellules tubulaires proximales du rein n'est pas surprenante au cours du saturnisme. Il est connu depuis longtemps que l'intoxication chronique par le

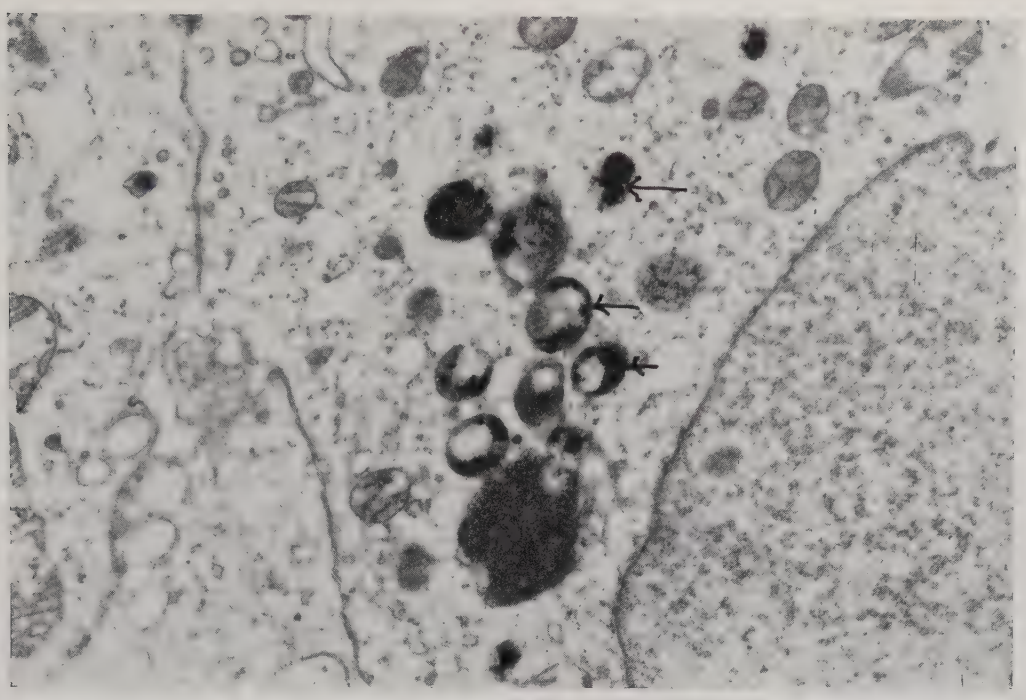


FIG. 19. — Intoxication expérimentale par le plomb. On observe dans le cytoplasme de cette cellule tubulaire proximale la présence d'inclusions intracytoplasmiques.

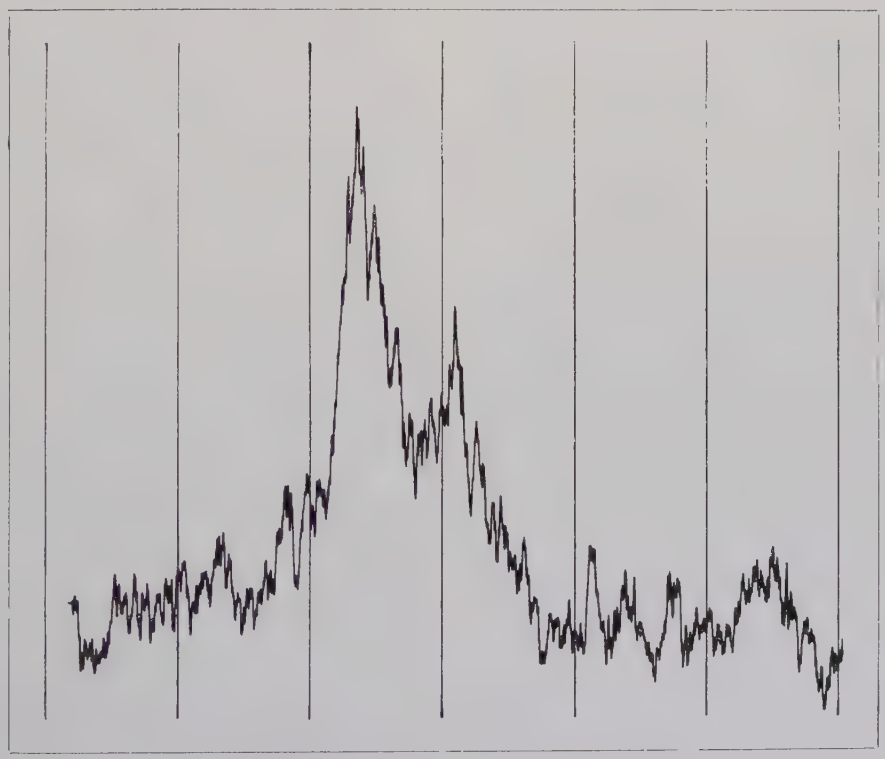


FIG. 20. — Microanalyse des inclusions intracytoplasmiques de la figure 19 : raies K α_1 et K α_2 caractéristiques du fer.

plomb provoque des troubles importants du métabolisme de l'hémoglobine ; plus précisément, il s'agit d'un blocage de la synthèse de ce corps dont les deux manifestations habituelles sont l'anémie et l'augmentation du taux du fer plasmatique. On sait d'autre part que le devenir du fer présent en excès dans l'organisme est très particulier ; celui-ci est en quelque sorte bloqué, il ne peut s'évacuer par les moyens d'élimination naturels et doit s'accumuler dans différents organes, en particulier dans le foie. Nous avons constaté en effet chez nos animaux, des inclusions importantes de fer dans cet organe, celles-ci étaient suffisamment volumineuses pour être directement mises en évidence par la microscopie optique et les méthodes histochimiques classiques (réaction de Perls).

Dans le rein, la présence de fer dans la cellule proximale est vraisemblablement en rapport direct avec la libération d'un excès de fer dans l'organisme et sa localisation élective dans la cellule proximale doit être en rapport avec le fait que la réabsorption tubulaire du fer a lieu électivement dans le segment initial du néphron.

Problèmes posés par les inclusions intranucléaires.

La présence d'inclusions intranucléaires est plus intéressante puisque, contrairement aux inclusions intracytoplasmiques qui sont susceptibles d'apparaître toutes les fois qu'il existe une surcharge en fer, il s'agit là d'images morphologiques ultrastructurales spécifiques de l'intoxication par le plomb, et celles-ci peuvent aider au diagnostic étiologique d'une néphropathie chronique d'étiologie indéterminée. Ces images sont en effet constamment retrouvées au cours du saturnisme (38) et d'autre part, leur aspect ultrastructural très particulier n'a jamais été retrouvé en dehors de cette affection.

Connues depuis bien longtemps, ces inclusions très particulières ont été étudiées à nouveau récemment par Beaver et ses collaborateurs (3). Les différentes tentatives histochimiques ont généralement montré qu'elles contenaient une assez grande quantité de protéine comportant des groupes sulfhydriles, une certaine quantité d'acide désoxyribonucléique, mais qu'elles ne contenaient ni fer, ni glycogène, ni mucopolysaccharides. La présence de plomb par contre était discutée ; s'il était à peu près sûr qu'il n'existait pas de dépôts de plomb sous forme métallique réduit, ou sous forme d'un sel minéral, la présence de plomb sous forme d'un complexe organique était par contre discutée (3, 47). Les résultats obtenus avec la microsonde (dans la mesure où les points examinés correspondent effectivement à ces dépôts) sont généralement en accord avec ceux de l'histochimie. On a pu déceler en effet la présence de soufre en rapport sans doute avec la présence des groupes sulfhydriles, de phosphore, en rapport peut-être avec la présence d'acide désoxyribonucléique ; le plomb par contre n'a pas été mis en évidence. Quant à l'osmium, il est vraisemblablement responsable en grande partie de la forte opacité que présentent ces dépôts lorsqu'ils sont examinés au microscope électronique.

6. Intoxication par le bismuth

Les lésions rénales provoquées par le bismuth ont été récemment étudiées au microscope électronique par Beaver (4). Ces études ont montré que la lésion initiale est localisée exclusivement au niveau du tube proximal, dans les cellules duquel on observe la présence d'inclusions anormales situées à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Nous avons analysé ces inclusions dans le but de préciser si elles contenaient ou non du bismuth, problème jusqu'ici discuté.

Conditions expérimentales.

Des lapins ont reçu chaque jour pendant 5 jours une injection sous-cutanée de sous-nitrate de bismuth. La dose totale injectée correspondait à environ 20 grammes de bismuth métal. Les lapins ont été sacrifiés le 10e jour.

Résultats.

a) *Microscope électronique.*

Nous avons retrouvé les inclusions intracytoplasmiques décrites par Beaver mais, par contre, nous n'avons pas pu retrouver les inclusions intranucléaires. Les inclusions intracytoplasmiques sont extrêmement denses et séparées du reste du cytoplasme par une membrane (fig. 21).

b) *Analyse à la microsonde.*

Ces inclusions ne contiennent pas le bismuth ou tout au moins, elles n'en contiennent pas en quantité suffisante pour que ce corps puisse être décelé. La forte densité des inclusions paraît ici simplement en rapport avec leur très forte osmiophilie. La présence d'osmium est toujours décelable sur nos préparations puisque celles-ci sont fixées par l'acide osmique, mais ici, cet élément apparaît concentré en certains points dans des proportions tout à fait inhabituelles ainsi qu'en témoigne le spectre représenté sur la figure 22. Les images observées au microscope électronique ne correspondent donc vraisemblablement qu'à des signes de dégénérescence cytoplasmique non spécifique. L'ultrastructure des inclusions anormales présentes dans les reins de malades ayant des néphropathies chroniques secondaires à des injections médicamenteuses bismuthiques est quelque peu différente de celle observée dans cette néphropathie expérimentale aiguë. Nous n'avons pas eu l'occasion d'examiner de telles néphropathies chroniques.

opaques aux rayons X ainsi qu'en témoignent les micro-radiographies effectuées sur les coupes histologiques ; il s'agissait donc vraisemblablement d'inclusions de nature minérale et de poids atomique relativement élevé, mais les différentes tentatives d'analyse chimique n'ont pas pu préciser quelle était la nature des corps présents dans ces inclusions.

L'analyse ponctuelle effectuée sur chacune de ces inclusions a permis de mettre en évidence les radiations caractéristiques du baryum. Etant donné leur nature, la présence de ces corps étrangers doit être évidemment secondaire au transit baryté, effectué dans les premiers jours de la vie, au cours duquel une fausse route a pu être pratiquée et dont la responsabilité dans l'apparition de l'emphysème lobaire paraît incontestable.

Cette observation doit inciter à la prudence dans l'emploi des opacifiants barytés en radiologie : ceux-ci ont en effet été proposés depuis quelque temps en remplacement du lipiodol pour les bronchographies ; si cet examen peut s'effectuer sans ennuis dans un certain nombre de cas, il semble prudent, à la lumière de cette observation, d'éviter au maximum leur utilisation dans ce but, et d'en proscrire dans tous les cas l'emploi chez l'enfant.

PROJET CONCERNANT LA RÉALISATION D'UNE MICROSONDE POSSÉDANT UN DISPOSITIF D'OBSERVATION DE L'ÉCHANTILLON PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Un dispositif spécial d'observation a été mis au point récemment par les laboratoires de C.A.M.E.C.A. (*). Son principe est le suivant : l'échantillon soumis au bombardement électronique émet d'une part des électrons rétro-diffusés dont l'énergie est voisine de celle des électrons incidents, et d'autre part des électrons secondaires dont l'énergie est de l'ordre de quelques dizaines d'électrons volts. Le nombre total d'électrons absorbés varie donc en raison inverse des deux grandeurs précédentes. On sait d'autre part que le nombre d'électrons rétro-diffusés est fonction du nombre atomique moyen du volume bombardé, et, il est donc possible, en mesurant en chaque point par un dispositif rapide de balayage le nombre d'électrons absorbés, de repérer les régions de la préparation contenant des éléments de poids atomique élevé. Il s'agit là, en quelque sorte, d'un dispositif de microscopie électronique par balayage.

La figure 37 est un exemple d'image susceptible d'être obtenue de cette façon sur une préparation biologique, il s'agit ici de l'image d'un dépôt de phosphate de calcium présent dans le rein d'un animal ayant une néphrocalcinose par hypervitaminose D. Ce dispositif, très commode pour détecter rapidement des dépôts ayant un certain volume, n'est par contre pas utilisable pour le repérage d'inclusions très petites.

La mise en évidence de telles inclusions n'est en fait possible dans de bonnes conditions qu'à l'aide d'une optique électronique fonctionnant suivant le mode classique. Un premier appareil permettant d'effectuer à la fois des images par microscopie électronique et une analyse ponctuelle par spectrographie de rayons X a été réalisé par Nixon (33). Cet appareil expérimental comporte deux canons à électrons opposés l'un à l'autre. Le premier est destiné à donner une image ultra-structurale de la préparation à l'aide d'une optique électronique classique, le deuxième est utilisé pour émettre les électrons de la sonde. Un autre dispositif de ce genre a été présenté plus récemment par Duncumb (16, 17). Ce dispositif ne comporte qu'un seul canon à électron utilisé soit pour former l'image, soit pour former la sonde. Cet appareil expérimental n'a pas été commercialisé.

Depuis plusieurs années, la firme Siemens étudie les possibilités d'adaptation d'une microsonde pour analyse spectrale X au microscope électronique « Elmiskop 1 ». L'utilisation du condensateur du microscope permet d'obtenir le rassemblement des électrons du faisceau, au niveau de la préparation, sur une surface d'environ deux microns de diamètre ; l'objectif normal est remplacé par un objectif à focale allongée (de 8,55 millimètres). L'analyse des rayons X est effectuée par un simple compteur proportionnel à flux gazeux ; celui-ci permet d'analyser les éléments de nombre atomique Z compris entre 13 et 40 (35), mais ce dispositif d'analyse simplifiée ne permet pas la séparation de deux éléments voisins dans la classification périodique ($\Delta Z = 1$) ; si $\Delta Z = 2$, on ne peut séparer deux éléments que si leurs concentrations sont voisines ; on n'obtient une bonne séparation des raies que lorsque $\Delta Z \geqslant 3$. Enfin la mise en évidence des éléments minéraux présents dans une inclusion n'est possible que dans les cas où ces éléments s'y trouvent à l'état fortement concentré. Néanmoins l'utilisation de ce dispositif nous a donné très aisément des résultats sur des coupes ultra-fines d'épaisseur voisine de 500 angströms dans lesquelles les inclusions étaient extrêmement denses. Ces inclusions étaient des cristaux d'hydroxyapatite (fig. 6). L'enregistrement spectral obtenu à partir de l'analyse d'un seul de ces cristaux est représenté sur la figure 39, la figure 38 correspondant à l'analyse d'un témoin de sulfate de calcium.

Cet appareil associe donc une optique électronique très perfectionnée permettant les plus hautes résolutions permises à l'heure actuelle et un dispositif simplifié de microanalyse par spectrographie de rayons X ; malgré son grand intérêt, il ne permet pas encore de résoudre les problèmes particuliers posés par les applications biologiques car la concentration de la matière minérale présente dans les inclusions intra-cellulaires est généralement beaucoup trop faible pour pouvoir être décelée par ce dispositif simplifié de microanalyse.

L'appareil le plus adapté à nos problèmes devrait, contrairement au précédent, associer un dispositif d'ana-

(*) Compagnie d'Applications Mécaniques à l'Electronique au Cinéma et à l'Atomistique.

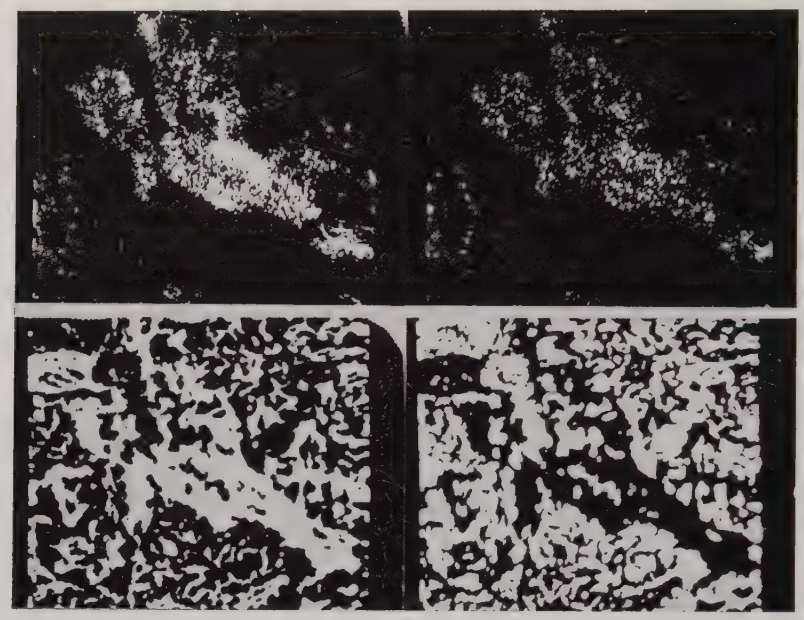


FIG. 37. — Analyse par balayage d'un dépôt anormal apparaissant au cours de l'intoxication par la Vitamine D. Chacune des quatre images a été obtenue par balayage de la même surface de coupe. En haut et à gauche : image X obtenue à partir de la radiation caractéristique K α_1 du phosphore. En haut et à droite : image X (radiation caractéristique K α_1 du calcium). En bas et à gauche : image électronique (négatif). En bas et à droite : image électronique (positif).

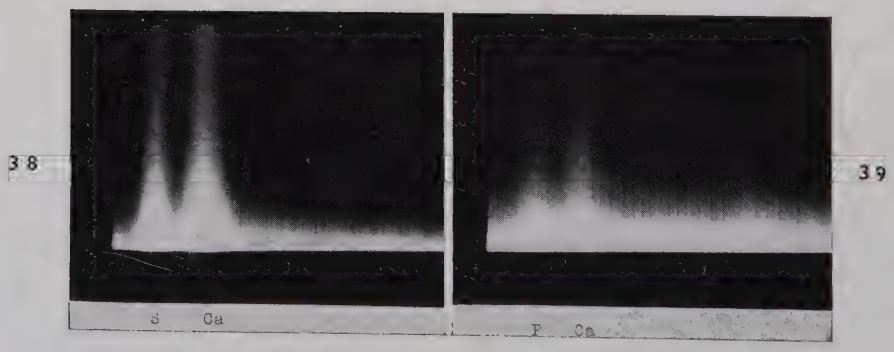


FIG. 38. — Microanalyse d'un échantillon témoin de gypse.
Les deux pics correspondent à la présence de soufre et de calcium.

FIG. 39. — Microanalyse d'un des cristaux représentés sur la figure 6.
Les deux pics correspondent à la présence de phosphore et de calcium.

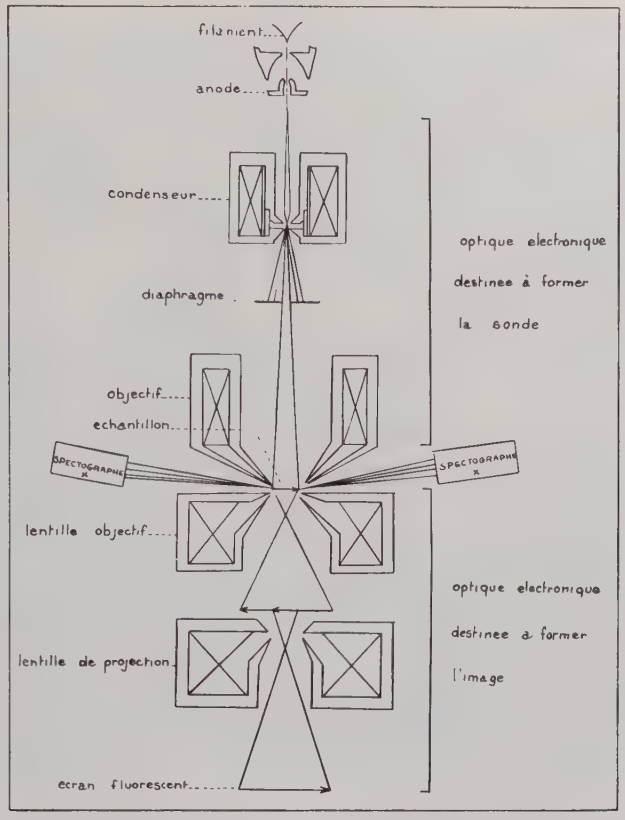


FIG. 40. — Schéma représentant le trajet de faisceau d'électrons dans une microsonde comportant un dispositif d'observation par microscopie électronique.

lyse spectrale aussi sensible et aussi précis que possible, et un dispositif d'observation par microscopie électronique qui lui-même pourrait être au contraire très simplifié sans inconvénient.

Il n'est pas nécessaire, en effet, que l'optique électronique soit très perfectionnée. Le repérage des inclusions qui nous intéressent, c'est-à-dire celles dont les dimensions sont, à la fois, trop petites pour être visibles au microscope à lumière, mais cependant suffisamment volumineuses pour contenir une quantité de matière analysable, nécessite un grossissement de l'ordre de 5 000 à 10 000 seulement. Dans ces conditions, une optique électronique très simplifiée peut suffire, un grossissement supérieur apparaît superflu et susceptible de compliquer inutilement l'appareil.

Un dispositif de ce genre est actuellement en cours d'étude dans le laboratoire de physique du solide de la Faculté des Sciences d'Orsay. Ce dispositif aurait l'avantage de pouvoir être adaptable sur les microsondes actuelles. Le trajet du faisceau électronique dans la microsonde dont on prévoit la modification est représenté sur la figure 40.

BIBLIOGRAPHIE

1. Angevine J. M., Kappas A. De Gowin R. L., Spargo B. H. — Renal tubular nuclear inclusions of lead poisining. *Arch. Path.*, 1962, *73*, 486.
2. Antoine B., Slama R., Josso F., De Montera H., Habib R., Richet G. — La destruction du parenchyme rénal par envahissement de cristaux d'oxalate de calcium. *Presse méd.*, 1960, *68*, 803.
3. Beaver D. L. — The ultrastructure of the kidney in lead intoxication with particular reference to intranuclear inclusions. *Amer. J. Path.*, 1961, *39*, 195.
4. Beaver D. L. Burr R. E. — Electron microscopy of bismuth inclusions. *Amer. J. Path.*, 1963, *42*, 609.
5. Birks L. S. — Electron probe microanalysis. 1 vol., 1963, Interscience Publishers, New York and London.
6. Blackman S. jr. — Intranuclear inclusion bodies in the kidney and liver caused by lead poisoning. *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 1936, *58*, 384.
7. Boyde A., Switsur J. R., Fearnhead R. W. — Application of the scanning electron probe X ray microanalyser to dental tissues. *J. Ultr. Res.*, 1961, *5*, 201.
8. Bracken E. C. Beaver D. L., Randall C. — Histochemical studies of viral and lead induced intranuclear bodies. *J. Path. Bact.*, 1958, *75*, 253.
9. Carlstrom D., Engfeldt B., Engstrom A., Ringertz N. — Studies on the chemical composition of normal and abnormal blood vessel walls. I. Chemical nature of vascular calcified deposits. *Lab. Invest.*, 1952, *2*, 235.
10. Castaing R. — Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle chimique et cristallographique. *Thèse Sci. Paris*, 1961, O.N.E.R.A. éd., Chatillon-sous-Bagneux, 1952.
11. Castaing R., Descamps J. — Sur la répartition en profondeur de l'émission X d'une anticathode. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, *237*, 1220.
12. Castaing R., Descamps J. — Sur les bases physiques de l'analyse ponctuelle par spectrographie des rayons X. *Le Journal de Physique et le Radium*, 1955, *16*, 304.
13. Castaing R., Descamps J. — Le dosage des éléments légers par le microanalyseur à sonde électronique. *La Recherche aéronautique*, 1958, *63*, 41.
14. Caufield J. B., Schrag P. E. — Electron microscopic study of renal calcification. *Amer. J. Path.*, 1964, *44*, 365,
15. Cohen S., Sweet A. Y., Mautner W., Churg J., Grisman E. — Light and electron microscopy of lead nephropathy. *Amer. J. Dis. Childr.*, 1960, *100*, 559.
16. Duncumb P. — An electron optical bench for microscopy, diffraction and X ray microanalysis. Fifth International Congress for Electron Microscopy. 1962, vol. 1, Ac Press ed., New York and London.
17. Duncumb P. — Precipitation study E.M.M.A., a combined electron microscope and X ray microanalyser. Technical Report n° 182 (Tube investments research laboratories Hinxton Hall, Cambridge, 1964).
18. Eisenstein (R.), Zernolis L. — An electron microscopic study of vitamin D induced aortic calcification. *Lab. Invest.*, 1963, *12*, 865.
19. Eisenstein R., Zernolis L. — Vitamin D induced aortic calcification. *Arch. Path.*, 1964, *77*, 27.
20. Engfeldt B., Gardell J., Hellstrom J., Ivemark B., Rhodin J., Srandh J. — Effect of experimentally induced hyperparathyroïdism on renal function and structure. *Acta Endocr.*, 1958, *29*, 15.
21. Fourman J. — Two distinct forms of experimental nephrocalcinosis in the rat. *Brit. J. Exp. Path.*, 1959, *40*, 464.
22. Galle P. — Mise en évidence au microscope électronique d'éléments cristallins dans les membranes basales de reins humains pathologiques. Morphologie des cristaux et diagrammes de diffraction électronique correspondants. *Rev. franç. Et. clin. Biol.*, 1962, *7*, 1084.
23. Galle P. — Mise au point d'une méthode de microanalyse des tissus biologiques au moyen de la microsonde de Castaing. *Rev. franç., Et. clin. biol.*, 1964, *9*, 203.
24. Galle P. — Etude comparée au microscope électronique et à la microsonde du rein pathologique. *J. Microscopie*, 1964, *3*, 347.
25. Galle P. — Oxalose rénale expérimentale. Etude au microscope électronique et par spectrographie des rayons X. *Nephron*, 1964, *1*, 158.
26. Gouygou Ch. — Remarques sur l'anatomie pathologique des néphrocalcinoses. Actualités néphrologiques. 1960, 1 vol., Flammarion éd. méd., Paris.
27. Hass G. M., Trueheart R. E., Taylor C. B., Stumpe M. — An experimental histologic study of hypervitaminosis D. *Amer. J. Path.*, 1958, *34*, 395.
28. Lepoutre C. — Calculs multiples chez un enfant. Infiltration du parenchyme rénal par des cristaux. *J. Urol.*, 1925, *20*, 424.
29. Lison L. — Histochimie animale. 1 vol., Gauthier-Villars éd., Paris.
30. Martin G. R., Schiffmann E., Bladen H. A., Nylen M. — Chemical and morphological studies on the in vitro calcification of aorta. *J. Cell Bidogy*, 1963, *16*, 243.
31. Mellors R. C. — Electron probe microanalysis. I. Calcium and phosphorus in normal human cortical bone.*Lab. Invest.*, 1964, *13*, 196.
32. Mortensen J., Emmet J. L. — Nephrocalcinosis. A collective and clinicopathologic study. *J. Urol.*, 1954, *71*, 398.
33. Nixon W. C. — A double gun electron microscope for selected area analysis. Proc of the Eur. reg. Conf. on Electron Microscopy. 1960, 1 vol., N. V. Drykkery Trio ed., The Hugue.
34. Philibert J. — Les bases de l'analyse quantitative. Rapport présenté au 1er Congrès européen sur la microanalyse par sonde électronique. *Delft.*, sept. 1964.
35. Poen Sing Ong. — X rays analysis of the 15-70 angströms wavelength region. Rapport présenté au 1er Colloque européen sur la microanalyse par sonde électronique. *Delft.*, sept. 1964.
36. Policart A., Collet A., Daniel Moussard H., Pregermain S. — Sur la néphrocalcinose. Recherches expérimentales au microscope électronique. *Presse méd.*, 1960, *68*, 1735.
37. Porte A., Cussac Y., Stoelner P., Zahnd J. P. — Sur la formation et l'ultrastructure des cellules de régénération dans les tubes rénaux de souris intoxiquées par le nitrate d'uranyle. *C. R. Soc. Biol.*, 1963, *157*, 2079.
38. Richet G., Albahary C., Ardaillou R., Sultan C., Morel Marcger L. — Le rein du saturnisme chronique. *Rev. franç. Et. clin. biol.*, 1964, *9*, 188.
39. Rouberol J. M., Tong M., Weinryb E., Philibert J. — Dispositif de balayage automatique sur la microsonde C.A.M.E.C. A. Principe et exemples d'application. Publication de l'I.R.S.I.D., Série A, n° 287, 1964, St-Germain-en-Laye (S.-et-O.).
40. Schneider A. F., Reaven E. P., Reaven G. — A comparaison of renal calcification produced by parathyroid extract or calcium gluconate. *Endocrinology*, 1960, *67*, 733.
41. Stoelner P., Cussac Y., Porte A., Batzenschlager A. — Sur les modifications ultrastructurales observées dans les tubes rénaux de souris traitées par le nitrate d'uranyle. *C. R. S. Soc. Biol.*, 1963, *157*, 2301.
42. Stone R. S., Bencosme S. A., Latta H., Madden S. C. — Renal tubular fine structure. *Arch. Path.*, 1961, *71*, 160.
43. Switsur V. R., Boyde A. — A consideration of some desingn features of a scanning microanalyser for biological application. X ray optics and X ray microanalysis (Proceeding of the Third International Symposium), 1963, 1 vol., 485, Academic Press, New York and London.
44. Tanret P., Thomas J., Cottenot P. — Evolution des dépôts oxaliques et lipidiques au cours de la lithiase rénale expérimentale par l'éthylèneglycol et l'acide oxalique. *C. R. Soc. Biol.*, 1961, *155*, 1025.
45. Tousimis A. J. — Electron probe microanalysis of biological specimens. X-ray optics and X-ray microanalysis (Proceeding of the Third International Symposium), 1963, *1*, 539, Academic Press, New York and London.
46. Tousimis A. J., Adler I. — Electron probe X-ray microanalyser study of copper within descemet's membrane of Wilson's disease. *J. Histo-chemistry and Cyto-chemistry*, 1963, *11*, 40.
47. Watrach A. M., Vatter A. E. — The nature of inclusion bodies in lead poisoning. Fifth International Congress for Electron Microscopy, 1962, vol. 2, Academic Press ed. New York and London.
48. Watrach A. M. — Degeneration of mitochondria in lead poisoning. *J. Ultr. Res.*, 1964, *18*, 177.
49. Webster D. C. — Direct and indirect characteristic X-rays. Their ratio as a function of cathode ray energy. *Proc Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1928, *14*, 330.
50. Williams E. J. — *Proc. Roy. Soc.* (*London*), 1932, *A 130*, 326.
51. Weissmann G., Weissmann S. — X-ray diffraction studies of human aortic elastin residues. *J. clin. Invest.*
52. Yu S. Y., Blumenthal H. T. — The calcification of elastic fiber. III. Various crystalline structures of apatite in human aortae. *Lab. Invest.*, 1963, *12*, 1154.

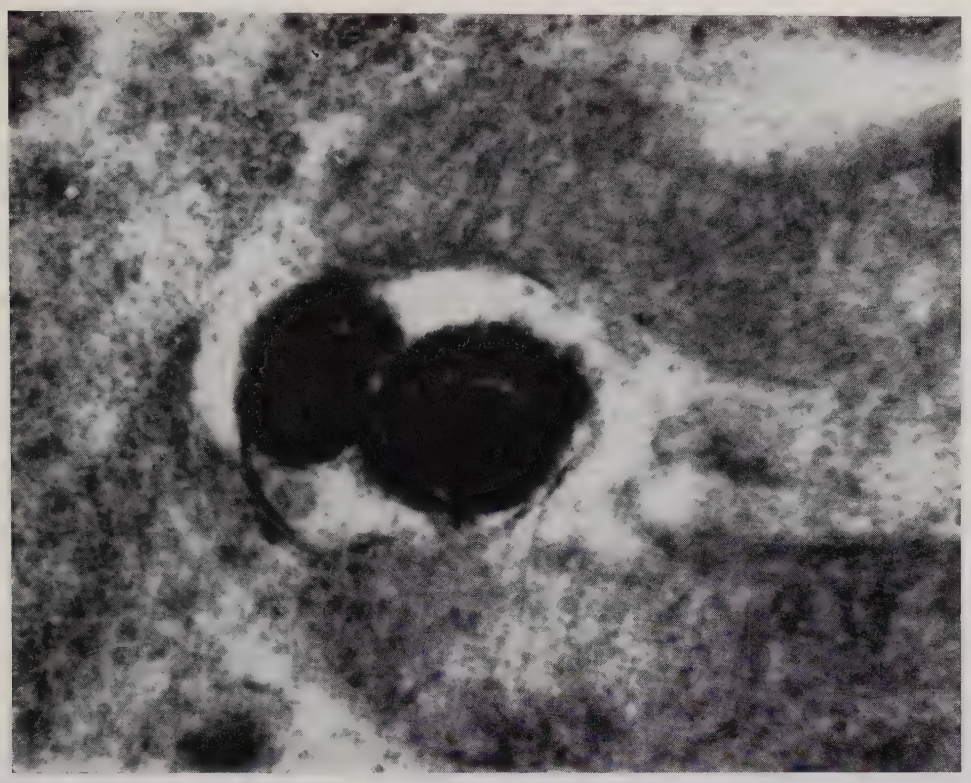


FIG. 21. — Intoxication expérimentale par le bismuth.
La figure met en évidence deux inclusions denses intracytoplasmiques.

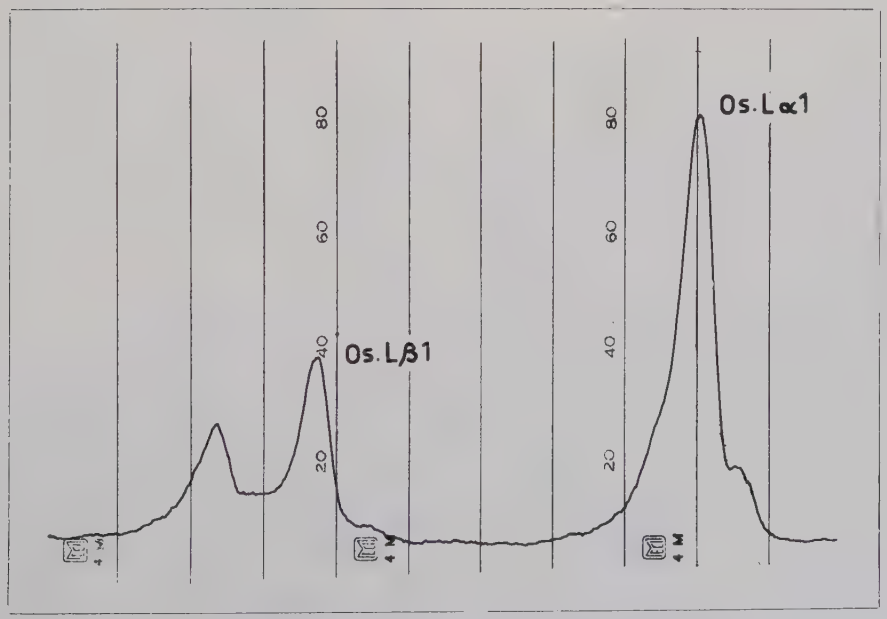


FIG. 22. — Microanalyse des inclusions intracytoplasmiques apparaissant au cours de l'intoxication expérimentale par le bismuth. Raies L α_1 et L β_1 de l'osmium (fixation osmique).

7. Intoxication par l'uranium

Bien connue depuis fort longtemps, la néphropathie expérimentale par le nitrate d'uranyle a été étudiée à nouveau récemment au microscope électronique par Stone d'une part et Porte d'autre part (42, 37). Les lésions glomérulaires et tubulaires ont été précisées, mais aucune méthode n'avait pu jusqu'alors déceler la présence d'uranium dans ces reins, ni préciser dans quelle partie du néphron celui-ci se localisait électivement.

Ce produit toxique a, pendant longtemps, été considéré comme provoquant des lésions essentiellement glomérulaires. Il ressort des travaux ultra-structuraux que les lésions sont surtout tubulaires et, plus accessoirement, glomérulaires. L'analyse à la microsonde nous a montré de plus que l'uranium se localisait électivement dans les cellules tubulaires proximales.

Conditions expérimentales.

Des rats de 200 grammes ont reçu chaque jour pendant 5 jours une injection sous-cutanée de deux centimètres cubes de solution contenant 2,25 milligrammes de nitrate d'uranyle [UO_2 (NO_3) $_2$,6 H_2O], puis sacrifiés le sixième jour. Une deuxième série de rats a reçu des doses identiques d'acétate d'uranyle [UO_2 (CH_3CO_2)$_2$, 2 H_2O].

Résultats.

Les lésions étaient tout à fait identiques dans les deux séries. La toxicité de ces produits pour le rein est donc essentiellement liée au radical uranyle.

a) *Examen au microscope électronique.*

L'étude au microscope électronique nous a montré tout d'abord que les lésions glomérulaires n'étaient pas très importantes, notamment nous n'avons à aucun moment retrouvé les fibrilles collagènes des régions interluminaires décrites antérieurement. Les seules lésions observées consistaient en une vacuolisation des cellules épithéliales avec dégénérescence des mitochondries. La discrétion de ces lésions glomérulaires était très remarquable chez ces animaux, généralement non anuriques, et dont l'insuffisance rénale était extrêmement importante (taux d'urée sanguine entre 6 et 10 grammes par litre). Les lésions tubulaires étaient par contre considérables et atteignaient surtout le segment proximal du néphron. En particulier, il a été possible de mettre en évidence dans le cytoplasme des cellules de cette portion du tubule de petites inclusions d'un type particulier, non encore décrites, et dont l'aspect évoque la nature cristalline. Ces inclusions sont assez nombreuses, leurs dimensions sont généralement de l'ordre de grandeur du micron ou légèrement supérieure ; elles sont constituées d'un amas de microcristaux en forme d'aiguilles ; elles siègent le plus souvent à l'intérieur de vacuoles intracytoplasmiques ou, plus rarement, dans la lumière tubulaire (fig. 23).

b) *Analyse à la microsonde.*

L'analyse à la microsonde des coupes semi-fines correspondantes nous a permis de mettre en évidence la présence d'uranium sous forme de dépôts de très petites dimensions. La figure 24 montre la raie L α_1 de l'uranium obtenue à partir d'un de ces dépôts. Il est évidemment très vraisemblable que les points où l'uranium a été décelé correspondent aux emplacements des inclusions cristallines observées au microscope électronique.

8. Intoxication par l'ion Al^{+++}

Conditions expérimentales.

Des rats de deux cents grammes ont reçu chaque jour pendant cinq jours, une injection intra-péritonéale d'une suspension colloïdale contenant 2,25 milligrammes de phosphate d'aluminium (PO_4Al). Les rats ont été sacrifiés le sixième jour.

Résultats.

a) *Microscopie optique.*

Les glomérules et les tubes rénaux présentent un aspect strictement normal.

b) *Microscope électronique.*

Les glomérules sont normaux. Dans les cellules tubulaires, il existe deux sortes d'inclusions bien différentes. Les unes sont sphériques, très denses, leur diamètre est généralement de l'ordre de grandeur du micron, elles sont intracytoplasmiques et séparées du reste de la matrice fondamentale du protoplasme par une fine membrane. Les autres ont une forme irrégulière, plus denses encore que les précédentes, leurs dimensions sont généralement inférieures à celles-ci, elles sont également situées dans le cytoplasme au centre duquel elles siègent sans interposition de membrane. Ces deux types de dépôts semblent siéger le plus souvent dans le segment proximal du néphron, et certaines cellules sont susceptibles de contenir à la fois ces deux variétés d'inclusions (fig. 25).

c) *Analyse à la microsonde.*

Cette analyse s'effectue là encore à l'aveugle puisqu'aucune de ces inclusions n'est visible au microscope optique. En certains points on décèle la présence d'aluminium en proportion notable (fig. 26) alors qu'en ces mêmes points, la présence de phosphore n'est jamais retrouvée. En d'autres points, il est possible par contre de déceler du phosphore, celui-ci étant toujours alors combiné au calcium (fig. 27). Cette analyse montre que la particule colloïdale n'est pas éliminée par le rein sous cette forme, mais qu'une dissociation préalable a eu lieu. On est en présence ici d'une double intoxication : l'une par l'ion Al^{+++} qui aboutit à la formation

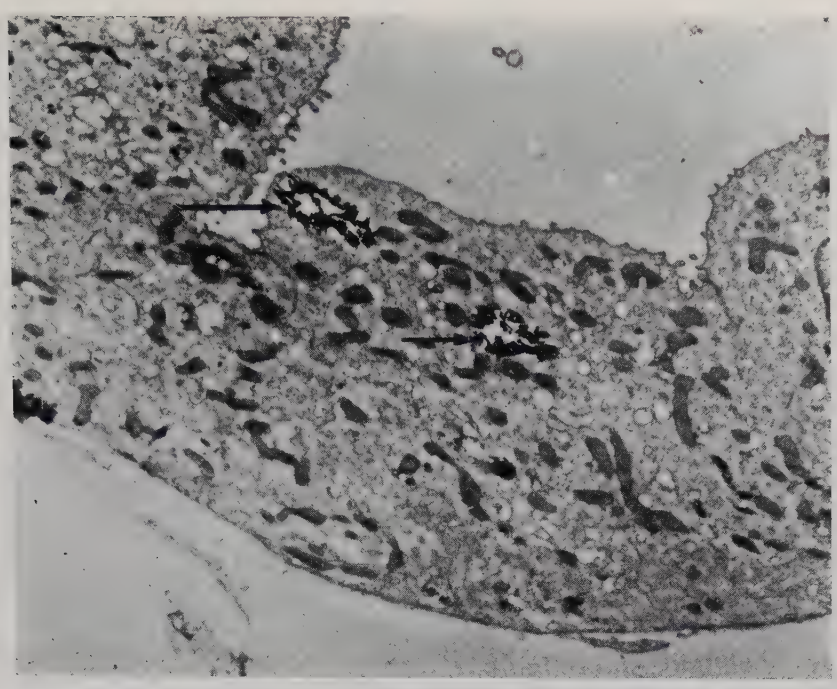


FIG. 23. — Intoxication expérimentale par le nitrate d'uranyle. La figure met en évidence deux inclusions intracytoplasmiques contenant des microcristaux en forme d'aiguilles.

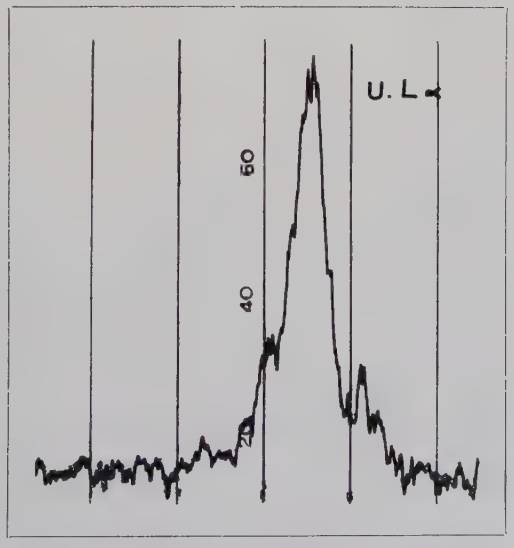


FIG. 24. — Raie L α_1 caractéristique de l'uranium obtenue à partir d'une des inclusions intracytoplasmiques apparaissant au cours de cette intoxication.

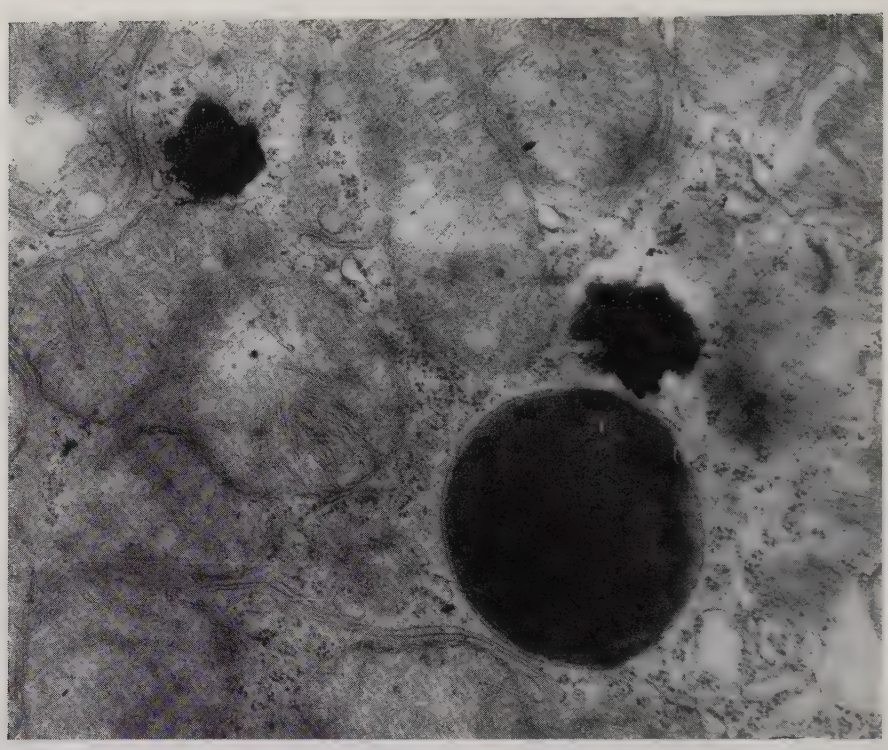
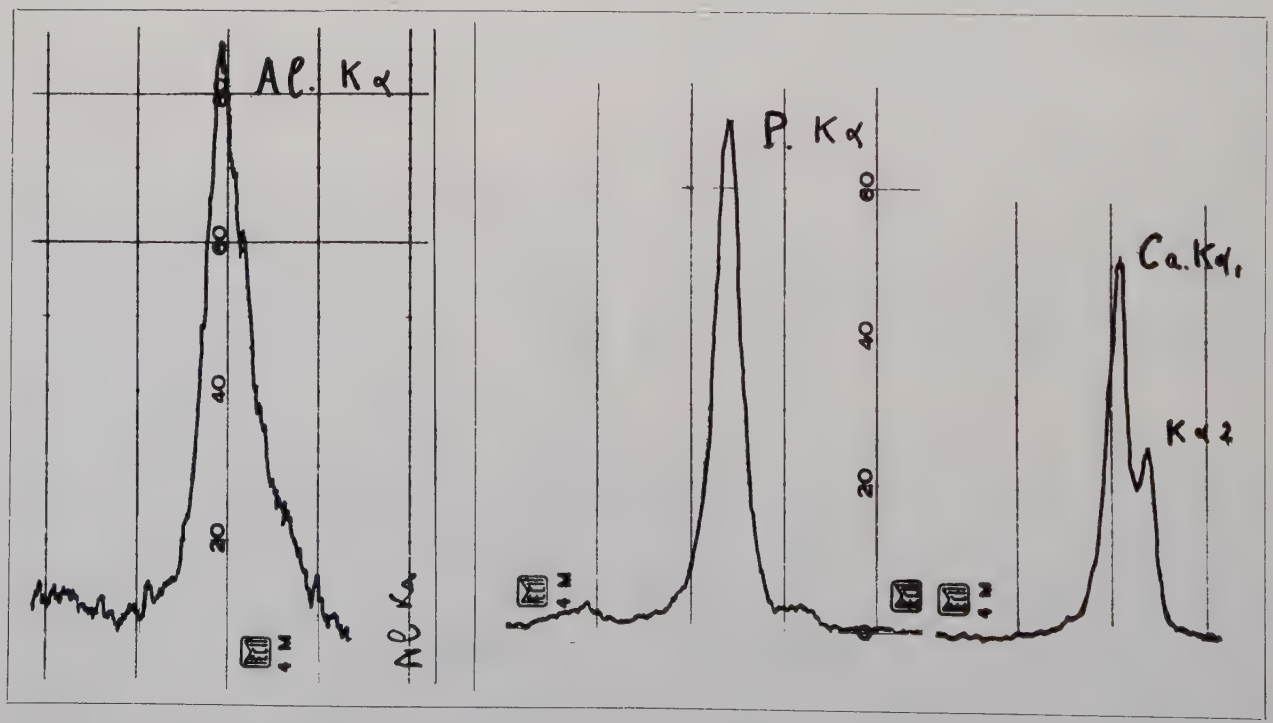


FIG. 25. — Intoxication expérimentale par le phosphate d'aluminium. On observe, à l'intérieur du cytoplasme de cette cellule tubulaire proximale, la présence de deux variétés d'inclusions denses. Une des inclusions est arrondie et séparée du reste du cytoplasme par une membrane. Les deux autres siègent au sein même de la matière cytoplasmique fondamentale.



26 27

FIG. 26. — Intoxication par le phosphate d'aluminium. Raie $K\alpha_1$ de l'aluminium obtenue par analyse ponctuelle d'une des deux variétés d'inclusions précédentes (vraisemblablement les inclusions rondes).

FIG. 27. — Intoxication par le phosphate d'aluminium. Raies $K\alpha_1$ du calcium et du phosphore obtenues à partir d'une des deux variétés d'inclusions précédentes (vraisemblablement les inclusions irrégulières).

d'une des deux variétés de dépôts décrites (vraisemblablement les inclusions sphériques), et l'autre par l'ion PO_4H^{--} qui aboutit à la formation de la deuxième variété d'inclusions. L'ultrastructure respective de ces deux types d'inclusions est intéressante à considérer : la première variété (inclusion sphérique entourée d'une membrane) correspond généralement à des dépôts d'une substance formée de complexes organométalliques. Ce type d'inclusions ne donne jamais de diagramme de diffraction électronique. D'autres exemples sont bien connus : les sidérosomes, inclusions intracytoplasmiques de fer sous forme de ferritine, sont également sphériques, séparés du reste du cytoplasme par une membrane et ils ne donnent jamais de diagramme de diffraction électronique. La deuxième variété, inclusion irrégulière, non séparée du reste du cytoplasme par une membrane et donnant parfois des diagrammes de diffraction électronique correspond au contraire à des substances minérales déposées sous forme de cristaux. Les oxalates de calcium monohydratés se déposent également sous cette forme et il est vraisemblable que la nucléation et la croissance du cristal s'effectuent ici au sein même de la matrice cytoplasmique fondamentale.

La présence de deux variétés d'inclusions invisibles au microscope optique à l'intérieur d'un même tissu, et parfois d'une même cellule, pose des difficultés d'interprétation puisqu'on ne peut, *a priori,* faire la correspondance entre l'image ultrastructurale et les résultats de l'analyse. Cette difficulté n'est pas très importante dans le cas présent puisque nous avons un élément de comparaison qui nous est donné par les résultats obtenus au cours de la surcharge en phosphate, mais, il n'en est pas toujours ainsi et nous verrons en pathologie humaine, que ces difficultés sont parfois insurmontables et ne pourront être résolues qu'en effectuant simultanément l'examen au microscope électronique et la microanalyse.

PROBLÈMES POSÉS PAR LES APPLICATIONS EN PATHOLOGIE RÉNALE

On peut disposer en clinique humaine de très petits fragments de reins pathologiques grâce à la pratique de la biopsie rénale. Les dimensions des fragments ainsi obtenus sont de quelques millimètres cubes, ils contiennent assez souvent de très petites inclusions intra ou extracellulaires dont la nature chimique nous est totalement inconnue et ceci est notamment le cas pour les biopsies de malades atteints de néphropathies chroniques d'origine indéterminée. L'analyse ponctuelle par spectrographie des rayons X trouve donc ici une excellente indication dans la mesure où ces inclusions contiennent de la matière minérale ; la densité de ces inclusions qui apparaît lors de leur examen ultrastructural permet d'ailleurs de prévoir que cette éventualité doit être assez fréquente. Nous avons donc examiné un certain nombre de biopsies. Certaines inclusions correspondent à des lésions analogues à celles obtenues expérimentalement. D'autres, par contre, sont très différentes.

Envisageons d'abord le cas des inclusions dont on connaît des analogies expérimentales.

Le syndrome de Burnett est une néphrocalcinose apparaissant chez des malades souffrant d'ulcère de l'estomac et ayant absorbé dans un but thérapeutique des doses excessives de calcium et de poudres alcalines. Les dépôts calcaires apparaissent ici dans les basales des tubes surtout proximaux, et ont une ultrastructure représentée sur la figure 28. L'analyse de ces dépôts met en évidence trois éléments : le calcium, le phosphore et le soufre, dans des proportions variables. Ces dépôts sont évidemment comparables dans leur morphologie et leur constitution chimique à ceux de la néphrocalcinose par surcharge en calcium.

Les reins d'un malade ayant reçu dans l'enfance des doses excessives de vitamines D ont été également examinés. Les différences observées expérimentalement entre la néphrocalcinose par surcharge en calcium et la néphrocalcinose par hypervitaminose D3 ont été retrouvées ici. Ces différences concernent, rappelons-le, l'aspect ultrastructural et la constitution chimique des dépôts.

Six malades atteints de saturnisme ont été examinés, les inclusions intranucléaires et intracytoplasmiques contenues dans la cellule tubulaire proximale ont été chaque fois retrouvées. La seule différence réside dans l'ultrastructure des dépôts intranucléaires qui apparaissent quelque peu différents lorsque l'intoxication par le plomb est prolongée (fig. 29). Les dépôts intracytoplasmiques contiennent à chaque fois du fer. L'analyse des dépôts intranucléaires est soumise aux mêmes réserves que celles effectuées chez l'animal.

Parmi les nombreux dépôts anormaux intra-rénaux retrouvés dans les biopsies dont il n'existe pas d'analogie en expérimentation animale, certains sont suffisamment volumineux pour être visibles au microscope optique, d'autres ne sont visibles qu'au microscope électronique. Seuls les premiers ont pu être analysés.

Deux malades porteurs de néphropathies chroniques d'origine inconnue avaient des lésions évoquant une néphrocalcinose, mais celle-ci était bien différente des quatre variétés précédemment décrites. En effet, les dépôts siègent ici dans les basales de la capsule de Browman, et, plus accessoirement, dans celles des tubes rénaux ; ces dépôts prennent légèrement la coloration de Stoelzner et ils sont biréfringents (fig. 30 et 31). Au microscope électronique, ils apparaissent comme un ensemble de très petits éléments dont les dimensions sont voisines du micron, et dont l'ultrastructure est représentée sur la figure 32. L'analyse à la microsonde nous a montré que certains dépôts contiennent du calcium, d'autres du phosphore, d'autres du silicium et d'autres (en moins grand nombre) de l'aluminium. Ces éléments s'associent de façon très variable, les associations les plus fréquentes sont : calcium + phosphore, calcium + phosphore + silicium, calcium + silicium + aluminium (aluminosilicate de calcium). Les spectres de ces

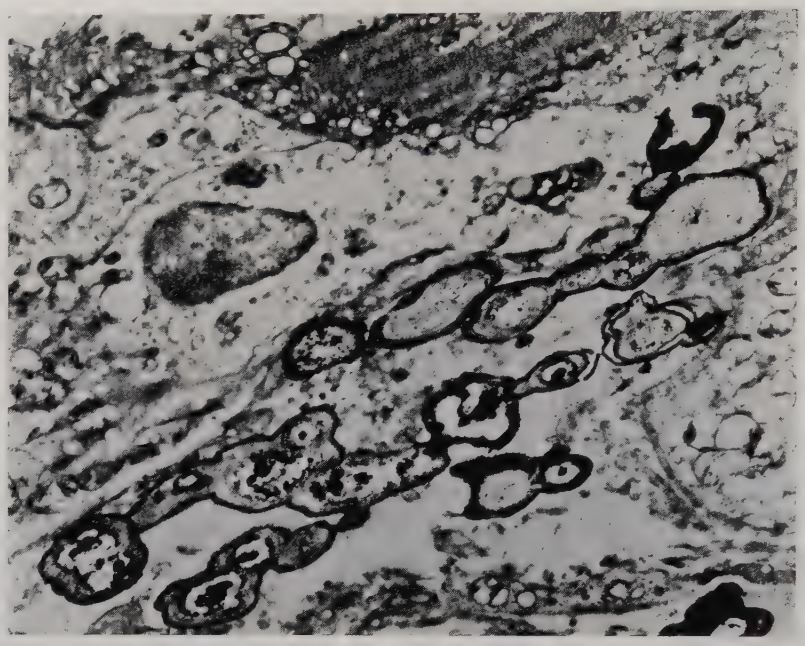


FIG. 28. — Syndrome de Burnett. Ultrastructure des dépôts calcaires présents dans les membranes basales des tubes contournés proximaux.

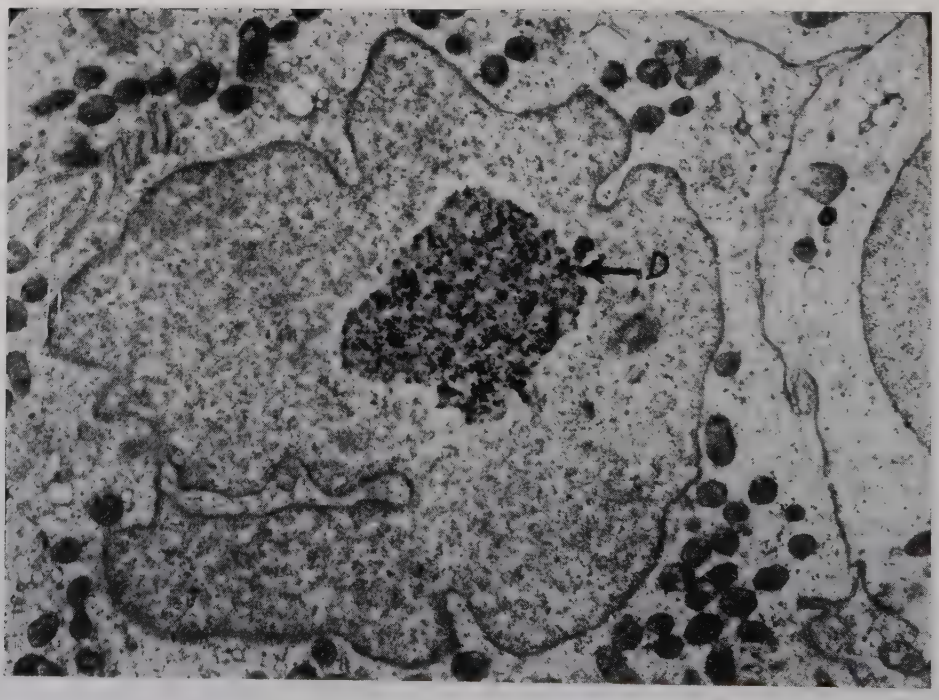


FIG. 29. — Saturnisme humain. Durée de l'intoxication : 20 ans. Ultrastructure d'un dépôt intranucléaire présent dans une cellule tubulaire proximale.

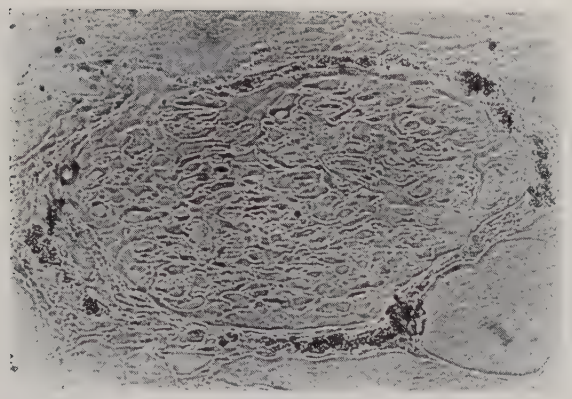


FIG. 30. — Néphropathie chronique d'origine inconnue. Micrographie optique d'une coupe semi-fine non colorée. La figure représente un glomérule, et on note la présence de dépôts anormaux dans la capsule de Bowman.

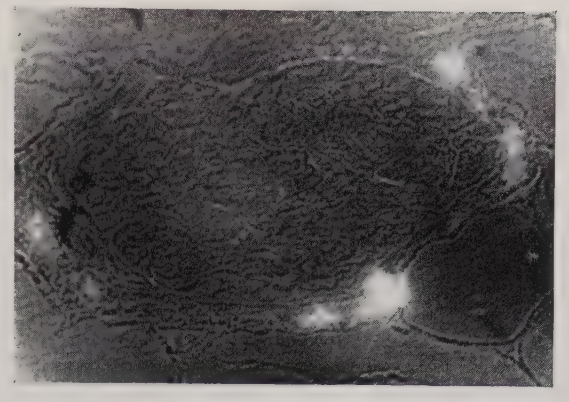


FIG. 31. — Micrographie prise au microscope polarisant, montrant la biréfringence des dépôts représentés sur la figure 30.

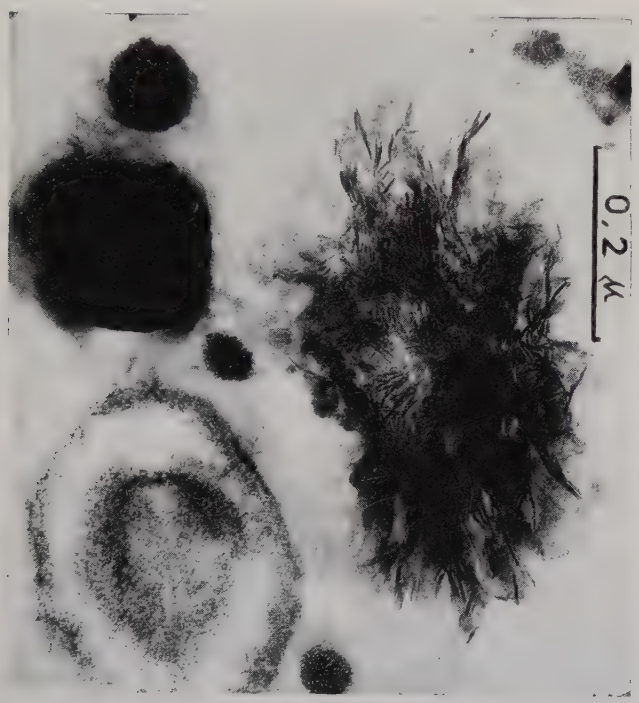


FIG. 32. — Micrographie électronique montrant l'ultrastructure des dépôts présents dans la membrane basale de la capsule de Bowman du glomérule représenté sur la figure 30. Il s'agit de microcristaux de formes variables siégeant au sein de la substance hyaline.

différentes substances sont représentés sur les figures 33 à 36.

L'enquête étiologique effectuée chez ces malades n'a pu mettre en évidence aucune notion d'intoxication chronique médicamenteuse ou alimentaire. Les métiers de ces malades ne les exposent apparemment à aucun contact anormal avec des poussières toxiques (silice).

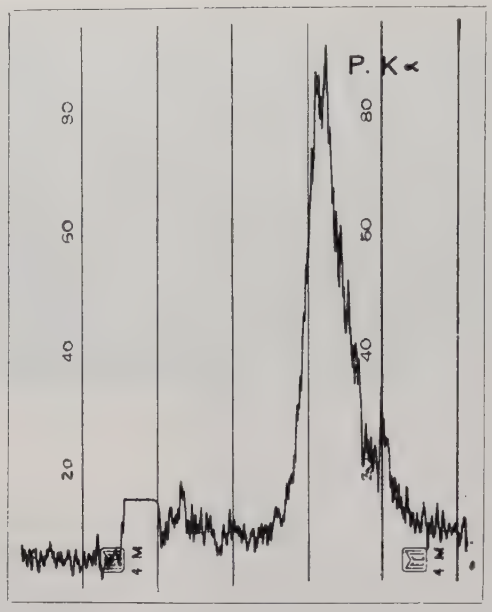
Le problème posé par les inclusions anormales visibles au seul microscope électronique présente des difficultés lorsqu'on ne possède, par ailleurs, aucun indice permettant de soupçonner à l'avance la nature de l'élément anormal et ces cas sont sans doute les plus intéressants : comme l'analyse s'effectue sur des volumes de matière extrêmement petits, il faudrait ici faire l'analyse spectrale complète des différents éléments de la classification pour chacun de ces volumes élémentaires. Même en prenant une sonde très large, ceci nécessiterait de répéter cette analyse des centaines et milliers de fois pour une surface de coupe aussi petite que 1 millimètre carré (un millimètre carré correspond à 10^6 microns carrés). Il devient donc absolument indispensable dans ces cas de disposer d'un système permettant de repérer à l'échelon submicroscopique les éléments de poids atomique élevé présents dans la préparation.

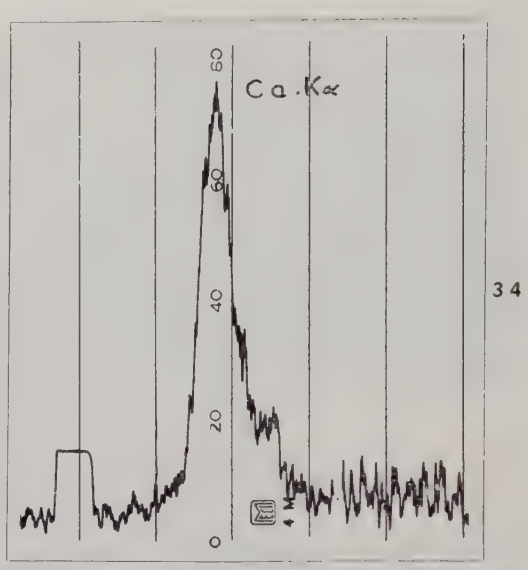
Avant d'envisager de quelle façon ce problème pourra être résolu, nous rapportons un dernier exemple d'application concernant l'analyse du tissu pulmonaire.

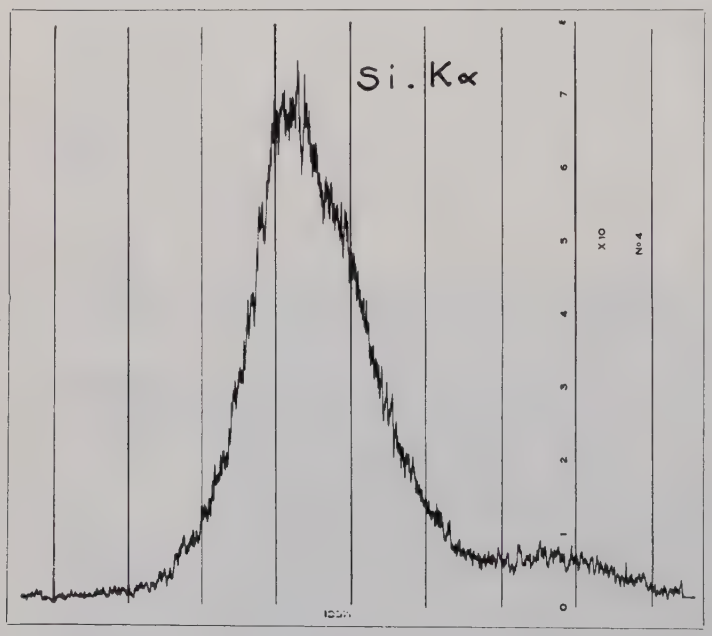
AUTRE APPLICATION DE L'ANALYSE PONCTUELLE : ÉTUDE D'UN CAS TRÈS INHABITUEL DE PNEUMOCONIOSE

Outre l'étude du tissu rénal, les applications de l'analyse ponctuelle en biologie apparaissent fort nombreuses et nous avons vu qu'une de ses applications les plus intéressantes était celle de l' « empoussiérage bronchique ». Nous rapportons ici à titre d'exemple particulièrement démonstratif l'étude d'un cas singulier de pneumoconiose dans laquelle la microanalyse nous a fourni des renseignements qui n'ont pu être obtenus par aucune autre méthode. Ces renseignements ont permis de préciser sans aucune ambiguïté la responsabilité du baryum dans un cas d'emphysème pulmonaire localisé à manifestations asphyxiques graves du nourrisson.

L'histoire de cet enfant est la suivante : dès les premiers jours de la vie, l'enfant a des vomissements répétés qui font pratiquer le huitième jour une radiographie de l'estomac. Celle-ci rattache les vomissements







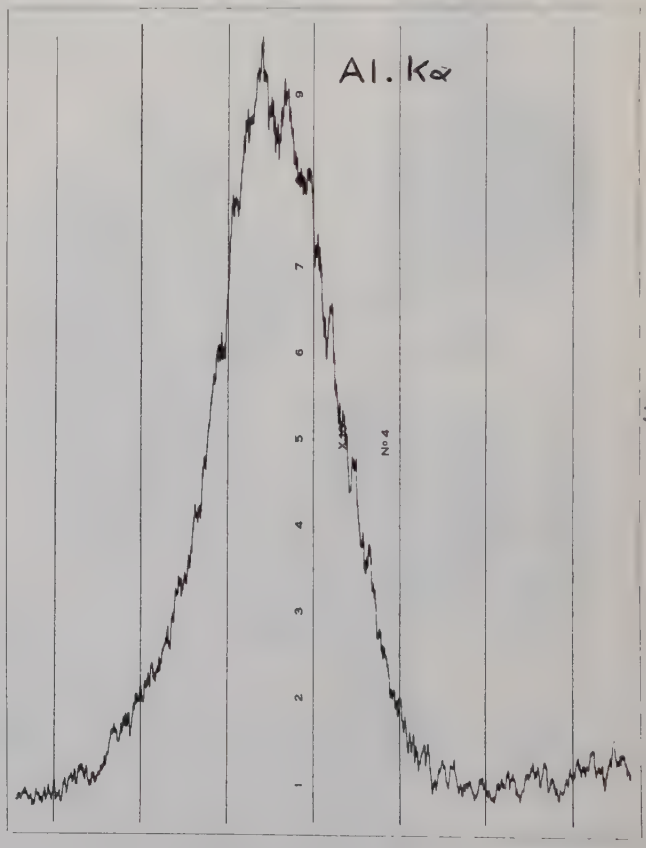


FIG. 33, 34, 35 et 36. — Raies caractéristiques des différents éléments présents dans les microcristaux représentés sur la figure 32.

à une petite hernie hiatale. Le traitement stoppe les vomissements qui ne récidiveront pas. A l'âge de trois mois l'enfant est hospitalisé à l'hôpital des Enfants-Malades dans le service du Professeur Julien Marie pour un syndrome asphyxique ; une série d'investigations est pratiquée : la bronchoscopie est normale, l'angiocardiographie élimine une malformation vasculaire, les radiographies pulmonaires mettent en évidence l'image d'un emphysème lobaire localisé ; le diagnostic d'emphysème malformatif par anomalie bronchique est porté. La gravité des signes respiratoires amène à faire pratiquer l'ablation chirurgicale du lobe pulmonaire moyen droit. Les suites opératoires sont simples ; l'enfant revu trois mois plus tard est entièrement guéri.

L'examen histologique de la pièce opératoire effectué par le docteur Watchi a apporté les précisions supplémentaires suivantes : la morphologie des bronches est normale mais il existe un grand nombre de granulomes à corps étrangers péri-bronchiques. Les corps étrangers, dont les dimensions sont de plusieurs microns, sont

opaques aux rayons X ainsi qu'en témoignent les microradiographies effectuées sur les coupes histologiques ; il s'agissait donc vraisemblablement d'inclusions de nature minérale et de poids atomique relativement élevé, mais les différentes tentatives d'analyse chimique n'ont pas pu préciser quelle était la nature des corps présents dans ces inclusions.

L'analyse ponctuelle effectuée sur chacune de ces inclusions a permis de mettre en évidence les radiations caractéristiques du baryum. Etant donné leur nature, la présence de ces corps étrangers doit être évidemment secondaire au transit baryté, effectué dans les premiers jours de la vie, au cours duquel une fausse route a pu être pratiquée et dont la responsabilité dans l'apparition de l'emphysème lobaire paraît incontestable.

Cette observation doit inciter à la prudence dans l'emploi des opacifiants barytés en radiologie : ceux-ci ont en effet été proposés depuis quelque temps en remplacement du lipiodol pour les bronchographies ; si cet examen peut s'effectuer sans ennuis dans un certain nombre de cas, il semble prudent, à la lumière de cette observation, d'éviter au maximum leur utilisation dans ce but, et d'en proscrire dans tous les cas l'emploi chez l'enfant.

PROJET CONCERNANT LA RÉALISATION D'UNE MICROSONDE POSSÉDANT UN DISPOSITIF D'OBSERVATION DE L'ÉCHANTILLON PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Un dispositif spécial d'observation a été mis au point récemment par les laboratoires de C.A.M.E.C.A. (*). Son principe est le suivant : l'échantillon soumis au bombardement électronique émet d'une part des électrons rétro-diffusés dont l'énergie est voisine de celle des électrons incidents, et d'autre part des électrons secondaires dont l'énergie est de l'ordre de quelques dizaines d'électrons volts. Le nombre total d'électrons absorbés varie donc en raison inverse des deux grandeurs précédentes. On sait d'autre part que le nombre d'électrons rétro-diffusés est fonction du nombre atomique moyen du volume bombardé, et, il est donc possible, en mesurant en chaque point par un dispositif rapide de balayage le nombre d'électrons absorbés, de repérer les régions de la préparation contenant des éléments de poids atomique élevé. Il s'agit là, en quelque sorte, d'un dispositif de microscopie électronique par balayage.

La figure 37 est un exemple d'image susceptible d'être obtenue de cette façon sur une préparation biologique, il s'agit ici de l'image d'un dépôt de phosphate de calcium présent dans le rein d'un animal ayant une néphrocalcinose par hypervitaminose D. Ce dispositif, très commode pour détecter rapidement des dépôts ayant un certain volume, n'est par contre pas utilisable pour le repérage d'inclusions très petites.

La mise en évidence de telles inclusions n'est en fait possible dans de bonnes conditions qu'à l'aide d'une optique électronique fonctionnant suivant le mode classique. Un premier appareil permettant d'effectuer à la fois des images par microscopie électronique et une analyse ponctuelle par spectrographie de rayons X a été réalisé par Nixon (33). Cet appareil expérimental comporte deux canons à électrons opposés l'un à l'autre. Le premier est destiné à donner une image ultrastructurale de la préparation à l'aide d'une optique électronique classique, le deuxième est utilisé pour émettre les électrons de la sonde. Un autre dispositif de ce genre a été présenté plus récemment par Duncumb (16, 17). Ce dispositif ne comporte qu'un seul canon à électron utilisé soit pour former l'image, soit pour former la sonde. Cet appareil expérimental n'a pas été commercialisé.

Depuis plusieurs années, la firme Siemens étudie les possibilités d'adaptation d'une microsonde pour analyse spectrale X au microscope électronique « Elmiskop 1 ». L'utilisation du condensateur du microscope permet d'obtenir le rassemblement des électrons du faisceau, au niveau de la préparation, sur une surface d'environ deux microns de diamètre ; l'objectif normal est remplacé par un objectif à focale allongée (de 8,55 millimètres). L'analyse des rayons X est effectuée par un simple compteur proportionnel à flux gazeux ; celui-ci permet d'analyser les éléments de nombre atomique Z compris entre 13 et 40 (35), mais ce dispositif d'analyse simplifiée ne permet pas la séparation de deux éléments voisins dans la classification périodique ($\Delta Z = 1$) ; si $\Delta Z = 2$, on ne peut séparer deux éléments que si leurs concentrations sont voisines ; on n'obtient une bonne séparation des raies que lorsque $\Delta Z \geqslant 3$. Enfin la mise en évidence des éléments minéraux présents dans une inclusion n'est possible que dans les cas où ces éléments s'y trouvent à l'état fortement concentré. Néanmoins l'utilisation de ce dispositif nous a donné très aisément des résultats sur des coupes ultra-fines d'épaisseur voisine de 500 angströms dans lesquelles les inclusions étaient extrêmement denses. Ces inclusions étaient des cristaux d'hydroxyapatite (fig. 6). L'enregistrement spectral obtenu à partir de l'analyse d'un seul de ces cristaux est représenté sur la figure 39, la figure 38 correspondant à l'analyse d'un témoin de sulfate de calcium.

Cet appareil associe donc une optique électronique très perfectionnée permettant les plus hautes résolutions permises à l'heure actuelle et un dispositif simplifié de microanalyse par spectrographie de rayons X ; malgré son grand intérêt, il ne permet pas encore de résoudre les problèmes particuliers posés par les applications biologiques car la concentration de la matière minérale présente dans les inclusions intra-cellulaires est généralement beaucoup trop faible pour pouvoir être décelée par ce dispositif simplifié de microanalyse.

L'appareil le plus adapté à nos problèmes devrait, contrairement au précédent, associer un dispositif d'ana-

(*) Compagnie d'Applications Mécaniques à l'Electronique au Cinéma et à l'Atomistique.

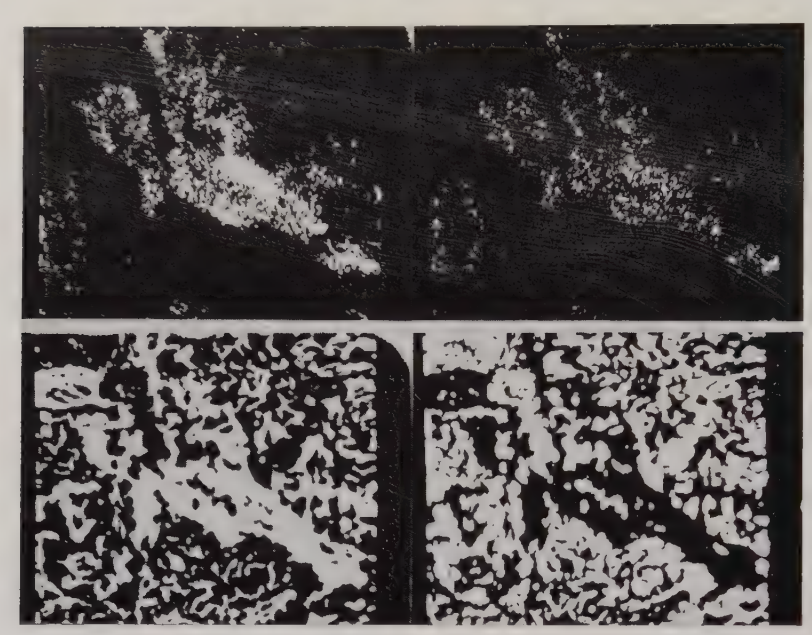


FIG. 37. — Analyse par balayage d'un dépôt anormal apparaissant au cours de l'intoxication par la Vitamine D. Chacune des quatre images a été obtenue par balayage de la même surface de coupe. En haut et à gauche : image X obtenue à partir de la radiation caractéristique K α_1 du phosphore. En haut et à droite : image X (radiation caractéristique K α_1 du calcium). En bas et à gauche : image électronique (négatif). En bas et à droite : image électronique (positif).

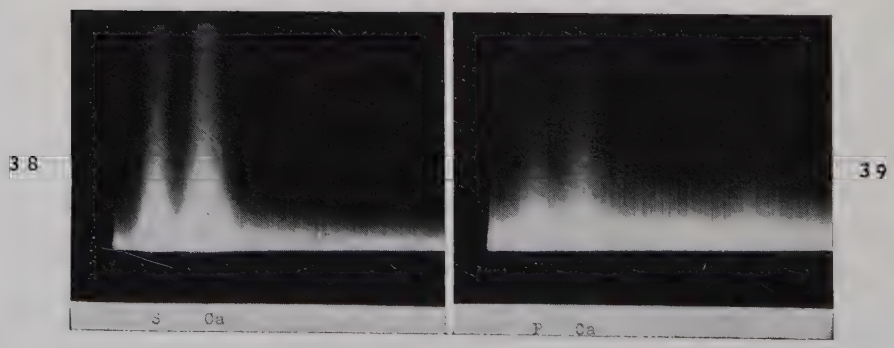


FIG. 38. — Microanalyse d'un échantillon témoin de gypse.
Les deux pics correspondent à la présence de soufre et de calcium.

FIG. 39. — Microanalyse d'un des cristaux représentés sur la figure 6.
Les deux pics correspondent à la présence de phosphore et de calcium.

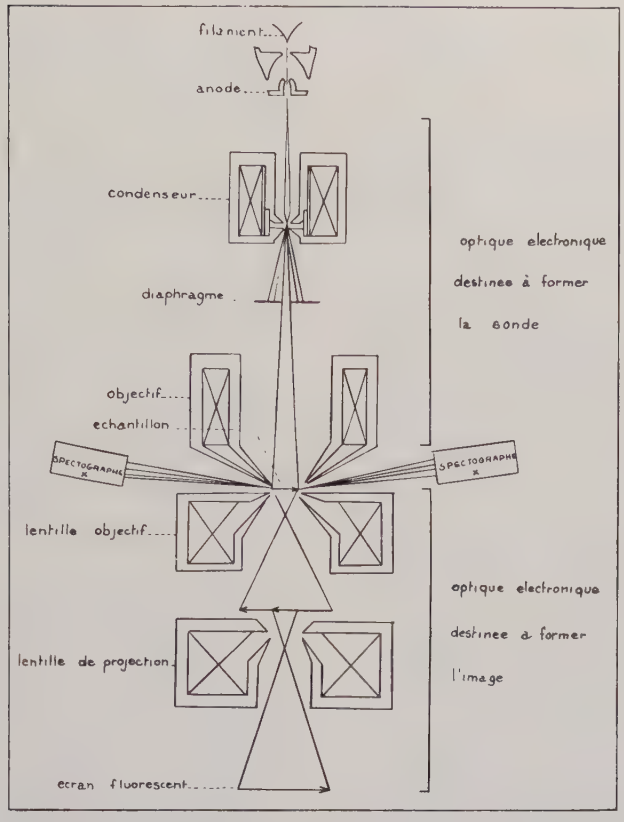


FIG. 40. — Schéma représentant le trajet de faisceau d'électrons dans une microsonde comportant un dispositif d'observation par microscopie électronique.

lyse spectrale aussi sensible et aussi précis que possible, et un dispositif d'observation par microscopie électronique qui lui-même pourrait être au contraire très simplifié sans inconvénient.

Il n'est pas nécessaire, en effet, que l'optique électronique soit très pertectionnée. Le repérage des inclusions qui nous intéressent, c'est-à-dire celles dont les dimensions sont, à la fois, trop petites pour être visibles au microscope à lumière, mais cependant suffisamment volumineuses pour contenir une quantité de matière analysable, nécessite un grossissement de l'ordre de 5 000 à 10 000 seulement. Dans ces conditions, une optique électronique très simplifiée peut suffire, un grossissement supérieur apparaît superflu et susceptible de compliquer inutilement l'appareil.

Un dispositif de ce genre est actuellement en cours d'étude dans le laboratoire de physique du solide de la Faculté des Sciences d'Orsay. Ce dispositif aurait l'avantage de pouvoir être adaptable sur les microsondes actuelles. Le trajet du faisceau électronique dans la microsonde dont on prévoit la modification est représenté sur la figure 40.

BIBLIOGRAPHIE

1. Angevine J. M., Kappas A. De Gowin R. L., Spargo B. H. — Renal tubular nuclear inclusions of lead poisining. *Arch. Path.*, 1962, *73*, 486.
2. Antoine B., Slama R., Josso F., De Montera H., Habib R., Richet G. — La destruction du parenchyme rénal par envahissement de cristaux d'oxalate de calcium. *Presse méd.*, 1960, *68*, 803.
3. Beaver D. L. — The ultrastructure of the kidney in lead intoxication with particular reference to intranuclear inclusions. *Amer. J. Path.*, 1961, *39*, 195.
4. Beaver D. L. Burr R. E. — Electron microscopy of bismuth inclusions. *Amer. J. Path.*, 1963, *42*, 609.
5. Birks L. S. — Electron probe microanalysis. 1 vol., 1963, Interscience Publishers, New York and London.
6. Blackman S. jr. — Intranuclear inclusion bodies in the kidney and liver caused by lead poisoning. *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 1936, *58*, 384.
7. Boyde A., Switsur J. R., Fearnhead R. W. — Application of the scanning electron probe X ray microanalyser to dental tissues. *J. Ultr. Res.*, 1961, *5*, 201.
8. Bracken E. C. Beaver D. L., Randall C. — Histochemical studies of viral and lead induced intranuclear bodies. *J. Path. Bact.*, 1958, *75*. 253.
9. Carlstrom D., Engfeldt B., Engstrom A., Ringertz N. — Studies on the chemical composition of normal and abnormal blood vessel walls. I. Chemical nature of vascular calcified deposits. *Lab. Invest.*, 1952, *2*, 235.
10. Castaing R. — Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle chimique et cristallographique. *Thèse Sci. Paris*, 1961, O.N.E.R.A. éd., Chatillon-sous-Bagneux, 1952.
11. Castaing R., Descamps J. — Sur la répartition en profondeur de l'émission X d'une anticathode. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, *237*, 1220.
12. Castaing R., Descamps J. — Sur les bases physiques de l'analyse ponctuelle par spectrographie des rayons X. *Le Journal de Physique et le Radium*, 1955, *16*, 304.
13. Castaing R., Descamps J. — Le dosage des éléments légers par le microanalyseur à sonde électronique. *La Recherche aéronautique*, 1958, *63*, 41.
14. Caufield J. B., Schrag P. E. — Electron microscopic study of renal calcification. *Amer. J. Path.*, 1964, *44*, 365,
15. Cohen S., Sweet A. Y., Mautner W., Churg J., Grisman E. — Light and electron microscopy of lead nephropathy. *Amer. J. Dis. Childr.*, 1960, *100*, 559.
16. Duncumb P. — An electron optical bench for microscopy, diffraction and X ray microanalysis. Fifth International Congress for Electron Microscopy. 1962, vol. 1, Ac Press ed., New York and London.
17. Duncumb P. — Precipitation study E.M.M.A., a combined electron microscope and X ray microanalyser. Technical Report n° 182 (Tube investments research laboratories Hinxton Hall, Cambridge, 1964).
18. Eisenstein (R.), Zernolis L. — An electron microscopic study of vitamin D induced aortic calcification. *Lab. Invest.*, 1963, *12*, 865.
19. Eisenstein R., Zernolis L. — Vitamin D induced aortic calcification. *Arch. Path.*, 1964, *77*, 27.
20. Engfeldt B., Gardell J., Hellstrom J., Ivemark B., Rhodin J., Srandh J. — Effect of experimentally induced hyperparathyroïdism on renal function and structure. *Acta Endocr.*, 1958, *29*, 15.
21. Fourman J. — Two distinct forms of experimental nephrocalcinosis in the rat. *Brit. J. Exp. Path.*, 1959, *40*, 464.
22. Galle P. — Mise en évidence au microscope électronique d'éléments cristallins dans les membranes basales de reins humains pathologiques. Morphologie des cristaux et diagrammes de diffraction électronique correspondants. *Rev. franç. Et. clin. Biol.*, 1962, *7*, 1084.
23. Galle P. — Mise au point d'une méthode de microanalyse des tissus biologiques au moyen de la microsonde de Castaing. *Rev. franç., Et. clin. biol.*, 1964, *9*, 203.
24. Galle P. — Etude comparée au microscope électronique et à la microsonde du rein pathologique. *J. Microscopie*, 1964, *3*, 347.
25. Galle P. — Oxalose rénale expérimentale. Etude au microscope électronique et par spectrographie des rayons X. *Nephron*, 1964, *1*, 158.
26. Gouygou Ch. — Remarques sur l'anatomie pathologique des néphrocalcinoses. Actualités néphrologiques. 1960, 1 vol., Flammarion éd. méd., Paris.
27. Hass G. M., Trueheart R. E., Taylor C. B., Stumpe M. — An experimental histologic study of hypervitaminosis D. *Amer. J. Path.*, 1958, *34*, 395.
28. Lepoutre C. — Calculs multiples chez un enfant. Infiltration du parenchyme rénal par des cristaux. *J. Urol.*, 1925, *20*, 424.
29. Lison L. — Histochimie animale. 1 vol., Gauthier-Villars éd., Paris.
30. Martin G. R., Schiffmann E., Bladen H. A., Nylen M. — Chemical and morphological studies on the in vitro calcification of aorta. *J. Cell Bidogy*, 1963, *16*, 243.
31. Mellors R. C. — Electron probe microanalysis. I. Calcium and phosphorus in normal human cortical bone.*Lab. Invest.*, 1964, *13*, 196.
32. Mortensen J., Emmet J. L. — Nephrocalcinosis. A collective and clinicopathologic study. *J. Urol.*, 1954, *71*, 398.
33. Nixon W. C. — A double gun electron microscope for selected area analysis. Proc of the Eur. reg. Conf. on Electron Microscopy. 1960, 1 vol., N. V. Drykkery Trio ed., The Hugue.
34. Philibert J. — Les bases de l'analyse quantitative. Rapport présenté au 1er Congrès européen sur la microanalyse par sonde électronique. *Delft.*, sept. 1964.
35. Poen Sing Ong. — X rays analysis of the 15-70 angströms wavelength region. Rapport présenté au 1er Colloque européen sur la microanalyse par sonde électronique. *Delft.*, sept. 1964.
36. Policart A., Collet A., Daniel Moussard H., Pregermain S. — Sur la néphrocalcinose. Recherches expérimentales au microscope électronique. *Presse méd.*, 1960, *68*, 1735.
37. Porte A., Cussac Y., Stoelner P., Zahnd J. P. — Sur la formation et l'ultrastructure des cellules de régénération dans les tubes rénaux de souris intoxiquées par le nitrate d'uranyle. *C. R. Soc. Biol.*, 1963, *157*, 2079.
38. Richet G., Albahary C., Ardaillou R., Sultan C., Morel Marger L. — Le rein du saturnisme chronique. *Rev. franç. Et. clin. biol.*, 1964, *9*, 188.
39. Rouberol J. M., Tong M., Weinryb E., Philibert J. — Dispositif de balayage automatique sur la microsonde C.A.M.E.C. A. Principe et exemples d'application. Publication de l'I.R.S.I.D., Série A, n° 287, 1964, St-Germain-en-Laye (S.-et-O.).
40. Schneider A. F., Reaven E. P., Reaven G. — A comparaison of renal calcification produced by parathyroid extract or calcium gluconate. *Endocrinology*, 1960, *67*, 733.
41. Stoelner P., Cussac Y., Porte A., Batzenschlager A. — Sur les modifications ultrastructurales observées dans les tubes rénaux de souris traitées par le nitrate d'uranyle. *C. R. S. Soc. Biol.*, 1963, *157*, 2301.
42. Stone R. S., Bencosme S. A., Latta H., Madden S. C. — Renal tubular fine structure. *Arch. Path.*, 1961, *71*, 160.
43. Switsur V. R., Boyde A. — A consideration of some desingn features of a scanning microanalyser for biological application. X ray optics and X ray microanalysis (Proceeding of the Third International Symposium), 1963, 1 vol., 485, Academic Press, New York and London.
44. Tanret P., Thomas J., Cottenot P. — Evolution des dépôts oxaliques et lipidiques au cours de la lithiase rénale expérimentale par l'éthylèneglycol et l'acide oxalique. *C. R. Soc. Biol.*, 1961, *155*, 1025.
45. Tousimis A. J. — Electron probe microanalysis of biological specimens. X-ray optics and X-ray microanalysis (Proceeding of the Third International Symposium), 1963, *1*, 539, Academic Press, New York and London.
46. Tousimis A. J., Adler I. — Electron probe X-ray microanalyser study of copper within descemet's membrane of Wilson's disease. *J. Histo-chemistry and Cyto-chemistry*, 1963, *11*, 40.
47. Watrach A. M., Vatter A. E. — The nature of inclusion bodies in lead poisoning. Fifth International Congress for Electron Microscopy, 1962, vol. 2, Academic Press ed. New York and London.
48. Watrach A. M. — Degeneration of mitochondria in lead poisoning. *J. Ultr. Res.*, 1964, *18*, 177.
49. Webster D. C. — Direct and indirect characteristic X-rays. Their ratio as a function of cathode ray energy. *Proc Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1928, *14*, 330.
50. Williams E. J. — *Proc. Roy. Soc.* (*London*), 1932, *A 130*, 326.
51. Weissmann G., Weissmann S. — X-ray diffraction studies of human aortic elastin residues. *J. clin. Invest.*
52. Yu S. Y., Blumenthal H. T. — The calcification of elastic fiber. III. Various crystalline structures of apatite in human aortae. *Lab. Invest.*, 1963, *12*, 1154.

Deuxième Thèse

Propositions données par la Faculté :

« EMISSION IONIQUE SECONDAIRE
DES ÉCHANTILLONS
BIOLOGIQUES »

Vu et approuvé :

Paris, le 1er juillet 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. ZAMANSKY.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

J. ROCHE.

Langres. — Imprimerie de Champagne
N° d'ordre 0.291. — Décembre 1967. — Dépôt légal 4e trimestre 1967.